

VERSUCHE ZUR SEROLOGISCHEN
CHARAKTERISIERUNG VON
ORTHOPOXVIRUS MIT HILFE
MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Disbui. München

1987

Renate Kern





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions - und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand : Prof. Dr. Dr. h.c.mult. A.Mayr
Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. H.Mahnel

VERSUCHE ZUR SEROLOGISCHEN
CHARAKTERISIERUNG VON ORTHOPOXVIRUS
MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig Maximilians - Universität
München

von
Renate Kern
aus
Langenloh

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. H. Zucker
Referent : Prof. Dr. H. Mahnel
Korreferent : Prof. Dr. J. Kösters

Tag der Promotion : 27. Februar 1987

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>SCHRIFTTUM</u>	3
2.1 Taxonomie der Orthopockenviren	3
2.2 Differenzierung der Orthopockenviren	7
2.2.1 Biologische Merkmale	7
2.2.2 Serologische Eigenschaften von Orthopockenviren	8
2.2.3 Monoklonale Antikörper	11
2.2.4 Restriktionsenzymanalyse der DNS von Orthopockenviren	12
2.3 Proteine von Orthopockenviren	14
2.3.1 Aufbau des Virions	14
2.3.2 Virusstrukturproteine	14
2.3.3 Virale Enzyme	20
2.3.4 " Frühe " und " späte " virale Proteine	21
2.4 Antigene von Orthopockenviren	23
2.4.1 Lösliche Antigene	23
2.4.2 Zellmembran - assoziierte virusspezifische Antigene	24
2.4.3 Virusgebundene Antigene	25
3. <u>MATERIAL und METHODEN</u>	31
3.1 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen	31
3.2 Zellkulturen	33
3.3 Virusmaterial	33
3.3.1 Virusstämme	33
3.3.2 Virusvermehrung und - reinigung	34
3.3.3 Virustitrierung	35
3.3.4 Elektronenmikroskopie	36
3.3.5 Proteingehaltsbestimmung	36
3.4 Hyperimmunserum	36
3.5 Herstellung monoklonaler Antikörper	37
3.5.1 Immunisierung der Mäuse	37
3.5.2 Zellfusionen	37
3.5.3 Gewinnung von Mäuseascites	38

	Seite
3.6 Untersuchung von Immunseren und Hybridoma - Zellkulturproben auf Antikörper	38
3.6.1 Neutralisationstest	38
3.6.2 ELISA - Technik	39
3.6.3 Bestimmung der Immunglobulin - Subklassen im ELISA	40
3.7 Reinigung monoklonaler Antikörper	41
3.7.1 Protein A - Affinitätschromatographie	41
3.7.2 Concanavalin A - Affinitätschromatographie	42
3.8 SDS - Polyacrylamidgel - Elektrophorese	42
3.8.1 Trennung der Proteine	42
3.8.2 Silberfärbung	43
3.9 Elektroblothing	43
3.9.1 Transfer auf Nitrocellulose - Membranen	43
3.9.2 Amidoschwarzfärbung von Nitrocellulose - Membranen	44
3.10 Immunoblotting	44
4. <u>ERGEBNISSE</u>	47
4.1 Optimierung des ELISA zum Nachweis von OPV - Antikörpern	47
4.2 Titration von Serumantikörpern in ELISA und Neutralisationstest	48
4.2.1 MVA - Antikörper in Kaninchenhyperimmunseren	48
4.2.2 Antikörper in Mäusehyperimmunseren	49
4.3 Monoklonale Antikörper gegen den VV - Stamm MVA	50
4.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper und Untersuchung im ELISA	50
4.3.2 Vermehrung der MAK - sezernierenden Zellklone in Mäuseasciten	53
4.3.3 Untersuchung der MAK im Neutralisationstest	56
4.3.4 Bestimmung der Immunglobulin - Klassen von MAK	56
4.4 Reinigung der MAK aus Mäuseasciten	58
4.4.1 Affinitätschromatographie mit Protein A - Sepharose	58
4.4.2 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A - Sepharose	61
4.4.3 Kombinierte Affinitätschromatographie mit Protein A - / Concanavalin A - Sepharose	64

	Seite
4.4.4 Identifizierung der Immunglobuline über SDS - PAGE	67
4.5 Spezifität der ELISA - Reaktion zwischen MAK gegen den VV - Stamm MVA und Orthopockenviren	70
4.5.1 Auswahl der Konjugate	70
4.5.2 Reaktionen von MAK in Mäuseasciten mit verschiedenen verschiedenen Orthopockenviren im ELISA	74
4.6 Trennung der Proteine von Vacciniavirusstämmen mittels SDS - PAGE	85
4.6.1 Virusreinigung	85
4.6.2 Auftrennung von Virusproteinen in der SDS - PAGE	85
4.7 Markierung von VV - Proteinen mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern im Western - Immunoblot	86
4.7.1 Amidoschwarzfärbung von Virusproteinen nach dem Transfer auf Nitrocellulose - Membranen	86
4.7.2 Optimierung der Methodik zur immunologischen Markierung von Virusproteinen mit Antikörpern	88
4.7.3 Immunologische Markierung von Virusproteinen mit Antikörpern in Kaninchen - anti - MVA - Hyperimmunserum	89
4.7.4 Immunologische Markierung von VV - Proteinen mit Antikörpern in anti - MVA - Mäusehyperimmunseren	91
4.7.5 Markierung von VV - Proteinen mit Antikörpern in Mäusehyperimmunseren gegen verschiedene VV - Stämme	92
4.7.6 Versuche zur immunologischen Markierung von VV - Proteinen mit monoklonalen Antikörpern gegen MVA	92
5. <u>DISKUSSION</u>	94
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	102
Summary	103
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	104

1. EINLEITUNG

Variola major und minor, die Pocken des Menschen, sind seit einigen Jahren erloschen. Dieser einmalige Erfolg der Seuchenbekämpfung ist durch die weltweite Impfung der Bevölkerung mit vermehrungsfähigem, dem Variolavirus immunologisch eng verwandten Vacciniavirus möglich geworden.

Zum Teil noch weit verbreitet sind dagegen mehrere Tierpockenviren, die auch für Menschen pathogen sind. Einige dieser Viren sind als Orthopockenviren sowohl mit dem Variola - als auch dem Vaccinia - Impfvirus eng verwandt und können nach Kontakt empfänglicher Personen mit infizierten Tieren heftige Lokalinfektionskrankheiten hervorrufen. Eine Impfung mit Vacciniavirus, wie früher üblich, oder einem geeigneten Ersatzimpfstoff würde gefährdete Menschen gegen diese Infektionen mit tierischen Orthopockenviren schützen.

Nach Aufhebung der nicht immer risikofreien Pockenschutzimpfpflicht nimmt der Impfschutz in der menschlichen Population rasch ab; immer mehr Menschen sind inzwischen wieder voll für Infektionen auch mit tierischen Orthopockenviren empfänglich. Man diskutiert deshalb weniger die Möglichkeit eines noch nicht bekannten tierischen Reservoirs für den Variolaerreger, als die einer eventuellen nicht einschätzbaren Gefährdung von gegen Pocken nicht mehr immunen Personen, insbesondere von Risikogruppen, die regelmäßig engen Tierkontakt haben oder aufgrund immunsuppressiver Zustände besonders empfänglich sind. Man kann nicht ausschließen, daß im Laufe der Zeit Tierpockenviren in diesem Umfeld ihre Virulenz steigern oder sich evtl. gefährliche Rekombinantenviren entwickeln.

Es bleibt deshalb eine Forschungsaufgabe, einerseits apathogene Vaccinia - Impfstämme für eine evtl. nötige gefährlose Schutzimpfung breiter Bevölkerungsschichten gegen tierische Orthopockenviren zu suchen, andererseits aber

auch neue Wege der Immunisierung gegen Pocken über die Entwicklung geeigneter Rekombinanten oder die Isolierung besonders immunkompetenter Antigene zu finden.

Die strukturelle und antigenetisch - immunologische Analyse des Vacciniavirus, das ein sehr breites, für die Anwendung vielversprechendes Wirtsspektrum aufweist, hat dafür grundlegende Bedeutung, zumal die antigenen, für die zelluläre wie humorale Immunantwort maßgeblichen Determinanten dieses ansonsten sehr gut untersuchten Virus nur unzulänglich bekannt sind.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zu diesem Fragenkomplex darstellen.

2. SONNERIETTUM

2.1 Taxonomie der Orthopockenviren

Die größten Viren werden in die Familie der Poxviridae eingeordnet. Ihre wichtigsten gemeinsamen Merkmale sind :

- ein quaderförmiges bis ovoides Virion mit einer Größe von 260 - 450 x 170 - 330 nm;
- eine charakteristische Innenstruktur bestehend aus zwei Lateralkörpern und dem Core, das die doppelsträngige lineare DNS mit einem Molekulargewicht von 85 - 240 x 10⁶ Dalton enthält;
- eine Virushülle, der tubuläre Proteinfilamente in typischer Anordnung eingelagert sind;
- die Virussyntese im Zytoplasma der Wirtszelle unter Bildung intraplasmatischer Einschlusskörperchen;
- ein allen Chordopoxviren gemeinsames Nukleoprotein - Antigen.

Die Familie der Poxviridae wurde in die Subfamilien Chordopoxvirinae (Vertebratenviren) und Entomopoxvirinae (Insektenviren) gegliedert (MATTHEWS, 1982). Derzeit sind etwa 40 Chordopoxvirusspezies bekannt; man ordnet sie nach serologisch - immunologischen, biologischen und morphologischen Gesichtspunkten sechs Genera zu. Zwischen den Genera wiederum bestehen, abgesehen von einem gemeinsamen serologisch nachweisbaren Nukleoprotein - Antigen, keinerlei immunologische Beziehungen.

Nicht systematisiert wurden bisher drei selbständige, differierende Virusspezies.

Dem Genus Avipoxvirus (Vogelpockenviren) sind derzeit sechs Spezies, die Hühner -, Tauben -, Puten -, Kanarien -, Wachtel - und Agapornidenpocken zugeordnet; weitere Arten von Greifvögeln und Sittichen werden diskutiert.

Dem Genus Capripoxvirus gehören das Schafpocken -, Ziegen -



pocken - und Lumpy skin disease - Virus des Rindes an. Im Genus Leporipoxvirus sind wesentliche Pockenviren der Nager, wie Kaninchenmyxom - und Fibromvirus, zusammen - gefaßt.

Das Genus Suipoxvirus wird vom Schweinepockenvirus (Sui - poxvirus suis) vertreten.

Im Genus Parapoxvirus sind verwandte Pockenerreger ein - geordnet, die sich morphologisch eindeutig von den übrigen Genera differenzieren lassen : Das länglich - ovale Virion (Achsenverhältnis 1,6 : 1 statt 1,3 : 1 bei den übrigen, mehr quaderförmigen Pockenviren) zeigt eine charakter - istische kokonartige Anordnung der Oberflächenfilamente. Vertreten sind die Erreger von Ekthyma contagiosum, Sto - matitis papulosa, Euterpocken und Kamel - Ekthyma.

Das erste und größte Genus der Chordopoxvirinae bilden die Orthopoxviren (OPV) mit mindestens zehn serologisch und immunologisch eng verwandten Virusarten und - varianten (MATTHEWS, 1982) .

Die Pockenerkrankung des Menschen, die durch das Variola major - Virus (OPV variolae) verursacht wurde, tritt nach weltweiten, Jahrhunderte anhaltenden Seuchenzügen heute nicht mehr auf (FENNER, 1979) . Die in Südamerika und Afrika endemisch vorkommenden " Kaffernpocken ", deren Erreger wegen des mildereren Krankheitsverlaufs als Variola minor - oder Alastrimvirus bezeichnet wird, sind heute ebenfalls getilgt. Echte Menschenpocken wurden nach konsequenten, weltweiten Impfkationen seit 1980 nicht mehr festgestellt. Dies war nur möglich, da ein potenter Impfstoff zur Verfügung stand, keine latenten Infektionen beim Menschen vorkamen und bis heute kein tierisches Reservoir für OPV variolae gefunden wurde (FENNER, 1979) .

Das Vacciniavirus (OPV commune, VV, Impfvirus) ist das am besten erforschte Virus der OPV - Gruppe. VV hat das breiteste Wirtsspektrum aller Pockenviren. Empfänglich

sind praktisch alle Mammalier (BAXBY, 1977) und sogar Vögel (MAYR et al., 1984) . Erkrankungen treten mit abnehmender Häufigkeit und Schwere des Krankheitsverlaufs auf bei : Mensch, Rind, Kaninchen, Maus, Pferd, Esel, Affe, Schaf und Ziege (MAYR und MUNZ, 1965b) . Nach Aufhebung der allgemeinen Pockenschutz - Impfpflicht für Menschen wird eine abnehmende Verbreitung von VV durch frisch geimpfte Personen und damit geringere Erkrankungs - häufigkeit von Tieren erwartet.

Unklar ist bisher die genaue Abstammung von VV. Das von E. JENNER 1796 zur Schutzimpfung von Menschen eingesetzte Virus, damals als Krustenmaterial einer pockenkranken Kuh (vacca) , wurde in kontinuierlichen Passagen in Versuchstieren, Hühnerbruteiern und Zellkulturen bis heute zur Impfstoffherstellung weitervermehrt. Die ursprünglichen Eigenschaften haben sich durch die zahlreichen Passagen mit Sicherheit verändert, auch sind heute zahlreiche, in ihren biologischen Eigenschaften unterschiedliche VV - Stämme und Varianten bekannt. Die für Mensch und Tier stärker pathogenen Gehirn - adaptierten Stämme wurden als Neurovaccinia, die weniger pathogenen, über Hautpassagen gezogenen als Dermovaccinia bezeichnet (BAXBY, 1975a) . Das bei Kaninchen schwere generalisierende Pockenerkrankungen auslösende Kaninchenpockenvirus (OPV cuniculi) sowie das Pferdepockenvirus (OPV equi) werden als pathogene Varianten von VV angesehen.

Affenpocken (OPV simiae) wurden erstmals bei Primaten in Gefangenschaft isoliert (Kopenhagen, 1958) , Erkrankungen in freier Wildbahn sind dagegen extrem selten zu beobachten (v. MAGNUS et al., 1959) . Dagegen treten in den tropischen Regenwäldern West - und Zentralafrikas wiederholt menschliche Erkrankungen durch virulente Stämme des Affenpockenvirus auf. Klinisch sind diese Fälle oft nicht von Variola major zu unterscheiden, der Krankheits - ausgang ist häufig letal. Seit der erstmaligen Isolierung

bei einem kranken Kind 1970 in Zaire wurden 310 Fälle registriert (Weekly Epidem. Rec., 1985). Diese Zoonose tritt nur sporadisch und lokal begrenzt auf, da Mensch - Mensch Übertragungen nur zu 15% vorkommen (Weekly Epidem. Rec., 1984) .

Lange Zeit umstritten war die Bedeutung von sog. " white Pock - Isolaten " aus den Organen klinisch gesunder Affen und Nager, die mit keiner Labormethode von OPV variolae abgegrenzt werden konnten (MARENNIKOVA et al., 1972; ARITA und HENDERSON, 1976) . Diese dürften jedoch Labor - kontaminanten mit Variola - Virus darstellen (SUSCITO et al., 1985) .

Kuhpockenvirus (OPV bovis) verursachte früher vornehmlich in England, Holland und Frankreich Locken in Milch - viehherden (ENABI, 1977) . Seit 1970 wurde dagegen Kuhpockenvirus wiederholt von erkrankten anderen Tierarten isoliert, u.a. von Okapis, Elefanten, Carnivoren, Edentaten, Hauskatzen und Nagern (Lit. bei MARENNIKOVA et al., 1984) . Für den verlustreichen Tierpockenausbruch unter Großkatzen, Bären und Großen Ameisenbären im Moskauer Zoo 1973 (MARENNIKOVA et al., 1977) wurden infizierte weiße Ratten, die z.T. als Tierfutter dienten, verantwortlich gemacht. MARENNIKOVA et al. (1984) bezeichneten wildlebende Nager als natürliches Reservoir von Kuhpockenvirus, erkrankte Säugetierspezies einschließlich Mensch und Rind stellten lediglich die Endglieder der Infektionskette dar.

Originäre Büffelpocken (OPV bubali) traten bisher nur sporadisch und mit lokaler Begrenzung in Indien auf. Kamelpocken (OPV cameli) sind in Ländern mit Kamelhaltung epizootisch und durch ihren seuchenhaften Verlauf bei Ausbrüchen von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Elefantenpockenvirus wurde von erkrankten Zirkuselefanten (Stuttgart, 1971) isoliert und als eigene, allerdings

mit VV eng verwandte Virusspezies (OPV elefanti) klassifiziert (BAXBY und GHABOOSI, 1977) .

Bei empfänglichen Personen können Pockenerkrankungen durch alle OPV - Arten, mit Ausnahme des in Mäusezuchten weit verbreiteten Mäusepockenvirus (OPV muris, Ektromelie - Virus) auftreten (Lit. bei MAHNEL, 1974) .

2.2 Differenzierung der Orthopockenviren

2.2.1 Biologische Merkmale

Die biologischen Eigenschaften der OPV bilden die Basis für ihre Differenzierung, da eine serologische Typisierung durch die enge serologische Verwandtschaft der OPV bisher nicht exakt möglich ist.

Alle OPV sind in Hühnerbruteiern, Zellkulturen und Versuchstieren gut züchtbar und lassen sich aufgrund ihrer Vermehrungsmerkmale zumindest grob differenzieren. Nach Beimpfung bebrüteter Hühnereier entwickeln alle OPV Pockenherde in der Chorioallantoismembran, die nach Form, Größe und nekrotischem, proliferativem oder hämorrhagischem Charakter unterschieden werden können. Die Virulenz des Virus wird anhand der Absterberate der Embryonen und der Virusgeneralisierung beurteilt. VV ist sehr virulent für das Brutei und bildet große nekrotische Herde, während Variola - und Alastrim - Virus weiße proliferative Herde bilden. Für Kuhpocken -, Büffel - und auch Affenpockenvirus sind hämorrhagische Läsionen charakteristisch, wobei " weiße " Varianten auftreten können (ARCHARD et al., 1984) . Die Vermehrung in Zellkulturen mit unterschiedlich ausgeprägtem cpE und das Plaquebildungsvermögen in Kultur sind weitere Parameter (MAYR und MUNZ, 1965a) . Alle OPV bilden bei Vermehrung im Brutei wie auch in Zellkulturen zytoplasmatische Einschlusskör-

perchen. Die vom Typ B stellen die " Virusfabriken " dar. Typ A Einschlußkörperchen treten nur bei bestimmten Stämmen von Kuhpocken -, Mäusepocken - und z.T. Elefantepockenvirus (BAXBY und GHABOOSI, 1977) auf (MAYR et al., 1984) . Nach kutaner und intrakutaner Infektion von Kaninchen vermehren sich alle OPV außer Variola -, Alastrim -, Kamel - und Mäusepockenvirus mit unterschiedlich rascher Bildung typischer lokaler Pocken. Kuh - und Affenpockenviren lösen i.d.R. eine schwere haemorrhagische Lokalreaktion mit Generalisierungstendenz und Kaninchenpocken - virus eine generalisierende, oft tödliche Allgemeinerkrankung aus. Am Küken haftet nur das VV nach follikulärer Infektion (MAYR, 1966) .

Ein wichtiges biologisches Differenzierungskriterium stellt die maximale Vermehrungstemperatur (" Ceiling - temperature ") dar, bei der sich OPV noch im Hühnerbrutei und in Zellkulturen züchten lassen. OPV variolae vermehrt sich nur bis $38,5^{\circ}\text{C}$ (BAXBY, 1975b) bzw. bis 39°C (MAHNEL und HERRLICH, 1961) , während VV bis 40°C und 41°C und Kuhpockenvirus bis 40°C vermehrungsfähig sind (BAXBY, 1975b) .

Abgesehen vom großen Zeitaufwand zur Standardisierung der Labormethoden, Vermehrung des Untersuchungsmaterials, Herstellung von Vergleichsproben und dem umstrittenen Einsatz von Versuchstieren wird die Sicherheit der Typisierung anhand biologischer Merkmale durch Auftreten zahlreicher Varianten und Stämme mit atypischen Eigenschaften verringert (BAXBY et al., 1979) .

2.2.2 Serologische Eigenschaften von Orthopockenviren

Die Verwandtschaft der OPV untereinander ist immunologisch durch sehr enge Beziehungen geprägt. Die Impfung oder Infektion mit einer OPV - Spezies erzeugt eine vollständige Kreuzimmunität gegen alle anderen OPV. Dieses Prinzip wurde bereits 1796 von JENNER bei den ersten Pockenschutz -

impfungen von Menschen gegen Variola major mit Material von " Kuhpocken " angewandt. Serologische Tests eignen sich aufgrund dieser Tatsache gut zum Nachweis einer OPV - Infektion, aber nur bedingt zur Differenzierung der OPV - Spezies untereinander.

Die Infektion eines Organismus mit einem Pockenerreger stimuliert sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunabwehr. Bereits 3 - 4 Tage p.inf. ist die zelluläre Abwehr in der Lage, mit Hilfe stimulierter zytotoxischer T - Lymphozyten infizierte Zellen vor der Freisetzung reifer Viruspartikel zu lysieren und somit Infektionen lokal zu begrenzen (MALLON et al., 1985) . In Makrophagen, die im ungeschützten Organismus ein wichtiges Vehikel der Virusgeneralisierung darstellen, vermehren sich bei ausgeprägter Immunität Pockenviren nicht mehr. Die humorale Immunität in Form zirkulierender Antikörper ist erst zwei Tage nach der zellulären nachweisbar und spielt eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Virusgeneralisierung. Humorale Antikörper allein können nicht gegen eine Pockenvirusinfektion schützen, sind aber Indikator für eine vorhandene zelluläre Immunität.

Viruspezifische neutralisierende Antikörper werden bei jeder Auseinandersetzung eines Organismus mit OPV gebildet. Diese steigen bei jeder Revakzination stark an und sind beim Menschen bis zu 20 Jahre lang nachweisbar (HERRLICH, 1967) .

Haemagglutinationshemmende Antikörper bildet der Organismus verzögert, sie bleiben nur Wochen bis Monate im Blutkreislauf (BAILEY und COBURN, 1979) und steigen nach einer Boosterimpfung nicht immer an.

Komplementbindende Antikörper werden nicht von jedem Wirt und offenbar altersabhängig gebildet, zusätzlich bestehen tierartliche Unterschiede.

Präzipitierende Antikörper werden mit der Agargelpräzipitationsreaktion nachgewiesen, bei allergischen Impfreaktionen scheinen sie gehäuft aufzutreten (EPP, 1961) .

Als Schnelltest zum Nachweis von Antikörpern gegen OPV ist sehr gut der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; MARENNIKOVA et al., 1981) geeignet.

Die serologische Differenzierung der OPV wird durch die in jedem Fall auftretenden Kreuzreaktionen erschwert. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität ist die Verwendung von Immunseren, die mit fraglichen homologen und bekannten heterologen Antigenen mehrfach adsorbiert wurden und dann zur Untersuchung des nicht bekannten Antigens eingesetzt werden.

GISPEN und BRAND - SAATHOF (1974) differenzierten im Agargel - Diffusionstest Variola -, Vaccinia - und Affen - pockenvirus mit kreuzadsorbierten Seren. Ebenfalls im Gel - Diffusionstest und zusätzlich im Kreuz - Komplement - fixationstest verglichen ESPOSITO et al. (1977) verschiedene Isolate von Variola -, Vaccinia - und Affen - pockenviren. Die Isolate Kuhpocken - ähnlicher Viren von erkrankten Zootieren aus europäischen Zoos (MARENNIKOVA et al., 1977) wurden von BAXBY et al. (1979) mit kreuz - adsorbierten Seren im Neutralisationstest untersucht und in enge verwandtschaftliche Beziehungen mit Kuhpocken - virus gerückt. Anhand von Kreuzneutralisationstesten und der Bewertung biologischer Merkmale wurden Pockenisolat von erkrankten Elefanten als OPV elefanti charakterisiert (BAXBY und GHABOOSI, 1977) . Weitere OPV - Stämme untersuchte BAXBY (1982) im Kreuzneutralisationstest auf der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier im Hinblick auf ihre Verwandtschaft. MARENNIKOVA et al. (1981) verwendeten den ELISA zur Differenzierung von Antikörpern gegen Affenpocken - und Vacciniavirus sowie " White Pock " - Isolate. Die auftretenden Kreuzreaktionen wurden ebenfalls durch Adsorption der Seren mit heterologen Antigenen vermindert und damit die Spezivität des Testes gesteigert.

Ein Nachteil der Herstellung monospezifischer Seren durch Kreuzadsorption liegt in der zeitraubenden Vermehrung der fraglichen Virusproben. Das Antigen muß im

Überschuß und mehrmals mit dem gleichen Serum inkubiert werden, um heterolog reagierende Antikörper sicher zu binden (SAMBY, 1982) .

2.2.3 Monoklonale Antikörper

Sehr eng verwandte Viren zu differenzieren ist neuer - dings mit Hilfe monoklonaler Antikörper (MAK) möglich. KOEHLER und MILSTEIN gelang 1975 erstmals die Fusion von Milzzellen hyperimmuner Mäuse mit einer permanenten Myelomzelllinie. Die entstandenen, spezifische Antikörper produzierenden Zellhybride (Hybridomas) wurden geklont; Zellpopulationen die von Einzelzellen abstammten, produzierten monoklonale, gegen nur eine antigene Determinante aus einem Antigenpool gerichtete Antikörper. MAK sezernierende Hybridoma - Zelllinien wurden bereits gegen zahlreiche Virusarten entwickelt (z.B. Influenza -, Tollwut -, Herpes - und Rotaviren; Lit.bei POLLOCK et al., 1984) und zur Stammdifferenzierung eingesetzt. MAK können mit herkömmlichen serologischen Methoden, wie Neutralisationstest, Haemagglutinationshemmungsreaktion, Komplementbindungsreaktion, ELISA u.a., auf ihre antigenspezifischen Reaktionen untersucht werden. Für weiter - gehende Untersuchungen eignen sich indirekte und direkte Immunofluoreszenztechniken und das Western-Immunoblotting - Verfahren. Als " Western Blotting " bezeichnet man den Elektrottransfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine, z.B. mittels der SDS - PAGE (SDS - Polyacrylamidgel - Elektrophorese) , vom Gel auf eine Matrix (z.B. Nitro - cellulose - Membranen; Verfahren nach TOWBIN et al., 1979) . Die Virusproteine können nach dem Transfer mit immunologischen Methoden markiert werden. Man setzt als erste Liganden polyklonale Immunsereen oder monoklonale Antikörper ein, diese wiederum werden mit radioaktiv - bzw. fluoreszeingebundenem Protein A oder enzymgekoppel - ten anti - Spezies Globulinen markiert. Die Ag - Ak -

Reaktion wird mit einer Enzym - Substrat - Reaktion sichtbar gemacht (TOWBIN und GORDON, 1984) .

Die Immunoblot - Technik kann bei großen Antigenen zur Untersuchung antigener Determinanten und deren Epitope dienen.

KITAMOTO et al. beschrieben 1984 MAK gegen Kuhpocken - virus und zwei Vacciniavirusstämme. Diese wurden in der indirekten Immunofluoreszenz und der Haemagglutinations - hemmungsreaktion auf ihre Reaktivität mit verschiedenen VV - Stämmen und Kuhpockenvirus untersucht. Die auftretenden Kreuzreaktionen bildeten einen Hinweis darauf, daß die MAK gegen gemeinsame antigene Determinanten gerichtet waren. In der Immunofluoreszenz wurden virus - infizierte Zellen nach sehr unterschiedlichen Mustern angefärbt.

MAK gegen Affenpockenvirus beschrieben ebenfalls 1984 ROUMILLAT et al. Die gewonnenen MAK neutralisierten Affenpockenvirus nicht, zeigten aber im Western - Immunoblot und in der Immunofluoreszenz starke Bindungen. Die drei isolierten Klone reagierten streng monospezifisch mit Affenpockenvirusstämmen, nicht dagegen mit VV, Variola - und Kuhpockenvirus.

Neutralisierende MAK gegen VV wurden erstmals 1985 von RODRIGUEZ et al. beschrieben. Drei ausgesuchte Klone neutralisierten VV durch eine Hemmung des Virusuncapping und reagierten im Western - Immunoblot sowohl mit VV als auch mit Kuhpocken - und Kaninchenpockenvirus.

2.2.4 Restriktionsenzymanalyse der DNS von Orthopockenviren

Das Genom der OPV besteht aus einer doppelsträngigen DNS mit einem Molekulargewicht von ca. 180 KD (kilobasen - paare) . Die DNS ist linear, an den Enden durch kovalente Brückenbindungen verbunden, hat eine Länge von 75 - 80 µm und stellt 3,2% der Virusmasse dar (WITTEK, 1982) . Die enge Verwandtschaft der OPV ist genetisch bedingt;

die einzelnen Virusspezies und Varianten unterscheiden sich nur in wenigen Basenpaaren. Eine sehr empfindliche Methode, Unterschiede der Nukleotidsequenzen festzustellen, ist die enzymatische Verdauung gereinigter Virus - DNS mit bakteriellen Restriktionsenzymen und Auftrennung der DNS - Bruchstücke in der Agargel - Elektrophorese. Für jede OPV - Spezies ist das Muster der Restriktionsenzym - bruchstücke charakteristisch. Virusisolate können durch Vergleich mit bekannten Virusstämmen unter Einbeziehung biologischer und serologischer Eigenschaften weitgehend typisiert werden.

WITTEK et al. verglichen 1977 die DNS von Kaninchenpocken - virus mit VV. Weitere vergleichende Arbeiten wurden von MULLER et al. (1978), ESPOSITO et al. (1978), MACKETT und ARCHARD (1979) durchgeführt. Speziell Variola - ähnliche Isolate von Pockenviren aus Affen (MARENNIKOVA et al., 1972) und " White Pock " - Isolate lassen sich aufgrund der Restriktionsenzymanalyse von OPV variolae unterscheiden (Lit. bei ESPOSITO et al., 1985). Die zentrale Region des Pockenvirus - DNS - Stranges mit einer Länge von 25 - 65 μ m ist innerhalb der einzelnen OPV - Spezies hochgradig konserviert und stabil. Die Nukleotidsequenzen dieser Region sind zu 73 - 94% homolog (MACKETT und ARCHARD, 1979). Virulenz und Wirtsspezifität von OPV werden von den austauschbaren, sich wiederholenden DNS - Sequenzen an den Enden bestimmt; Mutationen finden an den terminalen Basenpaaren des Genoms statt (MAYR et al., 1984). Avirulente Varianten weisen häufig eine verkürzte DNS aufgrund von Deletionsmutationen auf. Das Genom des attenuierten MVA - Stammes von VV ist 9% kürzer als das der virulenten Referenzstämme (MAYR et al., 1978). ARCHARD et al. (1984) stellten bei " White Pock " - Varianten von Kuhpockenvirus, die mit einer Frequenz von 1% auftreten, einen Basenverlust von 11,6% der DNS fest.

2.3 Proteine von Orthopockenviren

2.3.1 Aufbau des Virions

Pockenviren sind sehr komplex strukturiert und weisen zahlreiche Proteine verschiedenster Funktionen auf. Alle reifen Viruspartikel besitzen eine Virushülle; diese besteht aus einer phospholipidhaltigen Doppelmembran, wird in den zytoplasmatischen Virusfabriken synthetisiert und weicht in ihrer Zusammensetzung wesentlich von der der Zellmembran ab (STERN und DALES, 1974; HILLER et al., 1981a). Der Hülle sind Proteinfilamente mit tubulärem Aufbau in elektronenoptisch typischer Anordnung eingelagert. Nur aus Zellen ausgeschleustes, sog. extrazelluläres Virus besitzt eine zusätzliche äußere Membran, die von der Zellmembran gebildet wird (PAYNE, 1978). Bei derseits des bikonkaven Core (Nukleoid, Nukleokapsid) liegen zwei Lateralkörper. Die Begrenzung des Core bildet eine aus zylindrischen, dichtgepackten Untereinheiten zusammengesetzte Nukleoiddoppelmembran (MAYR et al., 1984); im Zentrum des Virions liegt die an das Nukleoprotein gekoppelte DNS (Lit. bei MOSS, 1974).

2.3.2 Virusstrukturproteine

Intakte Viruspartikel lassen sich durch Dissoziation mit stark ionisierenden Substanzen (z.B. SDS; Sodium - Dodecylsulfat) in ihre einzelnen Polypeptide aufspalten, diese wiederum in der Polyacrylamidgel - Elektrophorese (SDS - PAGE) auftrennen (LAEMMLI, 1970).

In den ersten Untersuchungen identifizierten HOLOWCZAK und JOKLIK (1967) am VV 17 Polypeptide, davon ein Hauptpolypeptid mit einem Anteil von nahezu 30% an der Virusmasse. 1972 trennten SAROV und JOKLIK bereits 30 Polypeptide mit Molekulargewichten von $8 - 200 \times 10^6$ (KD). Dieses Ergebnis entspricht einer codierenden Kapazität

der DNS von ca. 20% . Zahlreiche Autoren konnten bei Anwendung analytischer Methoden mit höherem Auflösungsvermögen weitere virale Polypeptide isolieren. STERN und DALES (1976a) beschrieben 56 Proteinbanden bei VV nach Auftrennung in der SDS - PAGE, während ESSANI und DALES (1979) im zweidimensionalen System (O'FARRELL, 1975) über 100 Polypeptide im Bereich von 8 - 96 KD identifizierten. Diese Ergebnisse wurden von OIE und ICHIHASHI (1981) annähernd bestätigt, die im gleichen System 84 Polypeptide auftrennen konnten.

Um die Ergebnisse unterschiedlicher Methoden und verschiedener Autoren untereinander vergleichbar zu machen, werden Proteine von Pockenviren nach ihren Molekulargewichten (MG) bezeichnet; eine Einteilung in 12 Untergruppen nach SAROV und JOKLIK (1972) konnte sich nicht durchsetzen.

Die Elektropherogramme der OPV - Spezies differieren nur geringfügig. So unterscheiden sich nach ARITA und TAGAYA (1980) Variola -, Alastrim - und Affenpockenvirusstämme von VV im Molekulargewichtsbereich 30 - 40 KD. Dabei sind bei VV - Stämmen sehr verschiedener Herkunft ebenfalls Unterschiede in diesem Bereich feststellbar. HARPER und BEDSON verglichen 1979 die Proteinmuster virusinfizierter Zellen im SDS - PAGE System. Die intrazellulären Polypeptide verschiedener Pockenvirusarten unterschieden sich deutlicher in ihren Elektropherogrammen als die kompletten Virionen. Die Autoren teilten die untersuchten OPV in vier Hauptgruppen ein : Vaccinia - ähnliche, Affenpocken-ähnliche, Variola - ähnliche und Kuhpocken - ähnliche Viren. Die Hauptunterschiede der Proteinmuster lagen im Bereich von 96 - 103 KD Molekulargewicht.

Eine Zuordnung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine zu einem Strukturelement des Virions ist bis jetzt nur teilweise möglich.

STERN und DALES (1976b) identifizierten ein Polypeptid mit 58 KD als die Hauptkomponente der tubulären Ober -

flächentrukturen. Bereits 1973 fanden KATZ und MARGALITH mit der Laktoperoxidase - Iodierungsmethode, die selektiv oberflächlich liegende Proteine markiert (PHILIPPS und MORRISON, 1970), vier Oberflächenproteine, darunter ein Glykoprotein; die Molekulargewichte wurden nicht bestimmt. HILLER et al. (1981b) identifizierten mit einer ähnlichen Methode ein 37 KD - Protein in der Hülle des Virions, das 5 - 7% der Virusgesamtmasse entspricht. HILLER und WEBER ermittelten 1982 ein weiteres Oberflächenprotein mit basischem Charakter, phosphoryliert und mit einem MG von 11 KD.

Die Behandlung intakter Virionen mit ionisierenden Detergentien, wie Nonidet NP 40, 2 - Merkaptoethanol (2-ME), Dithiothreitol, löst Oberflächenproteine vom Core ab; Virushüllen und Core lassen sich auf diese Weise trennen. HOLOWCZAK und JOKLIK (1967) bestimmten nach Behandlung mit 0,5% NP 40 und 2-ME drei Coreproteine. Nach SAROV und JOKLIK (1972) befinden sich 50% der Virusmasse im Core, wobei Polypeptide mit 63 und 58,5 KD die beiden Hauptkomponenten darstellen; weitere 15 von insgesamt 30 identifizierten Viruspolypeptiden sind Bestandteile des Core. Mit einer Kombination aus Laktoperoxidase - Iodierung, Fluoreszeinmarkierung und Trypsinverdauung ermittelten o.g. Autoren fünf in den Oberflächenstrukturen lokalisierte Polypeptide, die zusammen mehr als 20% der Virusmasse bilden; weiterhin zwei Glykoproteine mit MG von 39 und 41 KD in der das Core umgebenden Matrix. Zusätzlich bestimmten sie sechs Phosphoproteine, davon ein Hauptprotein mit einem MG von 11 KD, das sie weder der Virushülle noch dem Core zuordnen konnten.

ESSANI und DALES bestätigten 1979 das basische Phosphoprotein mit 11 KD, das Oberflächentubulusprotein mit 58 KD, zusätzlich ein 43 KD - Glykoprotein und die beiden Hauptcoreproteine mit 60 und 62 KD.

Eine umfassende Darstellung der Lokalisation viraler Proteine veröffentlichten ICHIHASHI et al. 1984. Durch abgestufte Behandlung mit verschiedenen Detergentien

brachten sie einzelne Strukturelemente von VV in Lösung. Die Inkubation mit NP 40 und 2-ME löste die Virushülle ab, übrig blieben Partikel aus Core und Lateralkörpern, letztere konnten durch Trypsinverdauung entfernt werden. Die Behandlung mit SDS löste alle phospholipidhaltigen äußeren und inneren Bestandteile des Virions bis auf die resistenten inneren Schichten der Nukleoiddoppelmembran und das DNS - haltige Nukleoprotein ab. Die Autoren erstellten folgendes Modell des Virusaufbaus :

Die Virushülle besteht aus einer SDS - löslichen lipid - haltigen Außenschicht und der unlöslichen inneren Basis - membran. In der äußeren Schicht sind zehn verschiedene Proteine mit MG von 54 bis 13 KD zu finden, dagegen besteht die innere Schicht der Hülle aus Komplexen von durch Disulfidbrücken stabilisierten Proteinen mit MG von 25 und 17 KD. Die Reduktion der Disulfidbrücken - bindungen gelingt mit 2-ME. Ein Polypeptid mit 13,8 KD bildet die Hauptkomponente der Lateralkörper neben weiteren Proteinen im MG - Bereich 70 bis 64 KD. Ein 61 KD - Protein bildet die äußere Schicht des Core und ein Komplex aus 57 und 22 KD - Polypeptiden die innere Lage. Das DNS - bindende Nukleoprotein besteht aus einem 27 und 13 KD - Komplex; hohe Affinität an die DNS weisen auch die basischen Proteine mit 57, 27, 13,8 und 13 KD auf. Bei der Virusreifung entstehen aus kleineren Untereinheiten hochmolekulare Proteine durch Disulfidbrücken - bindungen, die Polymerisation wird enzymatisch unterstützt.

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Autoren bei der Zuordnung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen zu Strukturelementen des Virions aufgelistet. Die unterschiedlichen, z.T. widersprüchlichen Ergebnisse der Autoren dürften vor allem technisch bedingt sein. Der Einsatz von verschiedenen PAGE - Verfahren führt zu variierenden Anzahlen gefundener Polypeptide. Die Größe der Polypeptide ist daneben von der Konzentration und Inkubationsdauer mit Detergentien und die MG von

TABELLE 1 : Zuordnung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (SDS - PAGE) zu Struktur -
elementen des Virions (Ergebnisse verschiedener Autoren) .

Lokalisation im Virion	Methode	Molekulargewicht (in KD)	Bemerkungen	Autoren
<u>Oberflächen - tubulusprotein</u>	1% NP 40	58	Hauptkomponente der filamentösen Ober - flächenstrukturen.	STERN und DALES, 1976a
<u>Virusober - fläche</u>	Laktoperoxi - dasemarkierung u.a.	/	4 Oberflächenproteine, davon 1 Glykoprotein.	KATZ und MARGALITH, 1973
		37	Nur bei EEV, 5 - 7% der Virushülle entsprechend.	HILLER et al., 1981b
		11	Basisches, phosphory - liertes Polypeptid.	HILLER und WEBER, 1982
<u>Virushülle</u>	0,5% NP 40; Laktoperoxi - dasemarkierung; Trypsinver - dauung.	56; 31; 16; 11,8; 8	5 Hüllproteine stellen zusammen 20% der Virus - hülle dar.	SAROV und JOKLIK, 1972
		210; 110; 89; 42; 37; 20 - 23	Nur bei EEV, insgesamt 9 Glykoproteine und 1 Polypeptid.	PAYNE, 1978
<u>Äußere Schicht der Hülle</u>	NP 40 und 2-ME	54; 37; 34; 32; 29; 21; 18; 16; 14,2; 13	10 Hüllproteine.	ICHIHASHI et al., 1984

<u>Innere Schicht der Hülle</u>	NP 40 und 2-ME	25 - 27	Polyeptidkomplex durch Disulfidbrücken.	ICHIHASHI et al., 1984
<u>Matrix um das Core</u>	/	39; 41	Glykoproteine.	SAROV und JOKLIK, 1972
<u>Core</u>	0,5% NP 40 und 2-ME.	/	3 Coreproteine	HOLOWCZAK und JOKLIK, 1967
	- " -	63; 58,8	2 Corehauptkomponenten, 17 von insgesamt 30 Virusproteinen bilden das Core, das allein 50% der Virusmasse ausmacht.	SAROV und JOKLIK, 1972
	- " -	62; 60	2 Corehauptkomponenten.	ESSANI und DALES, 1979
<u>Äußere Lage des Core</u>	0,5% NP 40, 2-ME und Trypsin -	61	1 Polypeptid.	ICHIHASHI et al., 1984
<u>Innere Lage des Core</u>	verdauung.	57 - 22	Polyeptidkomplex durch Disulfidbrücken.	- " -
<u>Lateralkörper</u>	- " -	13,8	Hauptkomponente der Later - alkörper, durch Disulfid - brücken als Polymer vor - liegend. Zahlreiche weitere kleinere Proteine.	- " -
<u>Nukleoprotein</u>	SDS u.a.	27 - 13	Proteinkomplex durch Disul - fidbrücken.	- " -

der Art des verwendeten Standards abhängig (ICHIHASHI et al., 1982) .

2.3.3 Virale Enzyme

Sehr wichtige virale Proteine ohne strukturelle Bedeutung stellen die viruseigenen Enzyme der Pockenviren dar. Pockenviren waren die ersten animalen Viren, bei denen Enzyme entdeckt wurden (Lit. bei MOSS, 1974) und die damit in der Lage waren, unabhängig von Enzymen der Wirtszelle mRNA zu synthetisieren. Während eines Pockenvermehrungszyklus wird nach der Penetration des Virus, noch vor dem Uncoating, der Zellstoffwechsel gestoppt. Dies geschieht durch ein im Core lokalisiertes basisches Phosphoprotein mit einem vermutlichen MG von 11 KD (BEN - HAMIDA et al., 1983) .

Die Transskription der viralen DNA ist von zahlreichen Transskriptionseenzymen abhängig :

Das erste identifizierte Enzym, eine DNA - abhängige RNA - Polymerase (1967, KATES und McAUSLAN) hat nach CHALLBERG und ENGLUND (1979) ein MG von 110 KD, während andere Autoren (Lit. bei FOGLESONG und BAUER, 1984; ESTEBAN et al., 1985) annehmen, daß dieses Enzym aus einem Komplex von zwei großen Polypeptiden mit mehr als 100 KD und mehreren kleinen Polypeptiden besteht. Der codierende DNA - Abschnitt wurde 1984 von JONES und MOSS kartiert.

Weitere an der Transskription beteiligte Enzyme sind : Guanylyltransferase, 7 - Methyltransferase (bestehend aus 92,5 und 26 KD - Untereinheiten; " Capping Enzyme "), 2 - O - Methyltransferase und Poly (A) - polymerase (Lit. bei FOGLESONG und BAUER, 1984) .

Indirekt an der Transskription beteiligte Enzyme sind : Proteinkinase, Ribonukleosidtriphosphat Phosphohydrolasen I und II, 5'Phosphat - Polynukleosid Kinase, DNA -

Topoisomerase I, DNS - bindende Proteine mit MG von 24 und 11 KD, DNS - Nukleasen mit pH - Optimum 4,5 bzw. 7,8 (MG 50 KD), Thymidin Kinase u.a. (Lit. bei ESTE - BAN et al., 1985; GOLINI und KATES, 1985) . Die Thy - midin Kinase (MG 19 KD) war das erste Enzym, von dem die codierende Basensequenz mit 0,6 - 0,7 Kilobasen - paaren ermittelt wurde (HRUBY und BALL, 1982) . Dieses Enzym dient bei Rekombinantensexperimenten als biolo - gischer Marker. In den Thymidin Kinase - Genomabschnitt können fremde Basensequenzen mit bis zu 25 Kilobasen - paaren eingebaut werden (SMITH und MOSS, 1984) .

2.3.4 " Frühe " und " späte " virale Proteine

Das VV - Genom, das 180 Kilobasenpaare enthält, kann theoretisch etwa 200 Polypeptide durchschnittlicher Größe codieren (WITTEK et al., 1984a) . Die gesamte DNS wird im Virion transskribiert, durch virale Enzyme modifiziert und an den zelleigenen Ribosomen transla - tiert. Im fertigen Virion wurden dagegen nur etwa 110 Polypeptide (ESSANI und DALES, 1979) identifiziert. Die Virusproteinsynthese läuft in mehreren Abschnitten ab und ist zeitlich von der DNS - Transskription ab - hängig. Innerhalb weniger Minuten nach der Infektion der Zelle tritt noch vor Beginn der DNS - Replikation frühe mRNS auf, die z.T. auch während der ganzen DNS - Synthese nachweisbar bleibt, teilweise aber mit Beginn der DNS - Replikation verschwindet. Frühe mRNS codiert frühe Proteine. Späte mRNS wird erst nach Abschluß der DNS - Replikation synthetisiert und wirkt z.T. sofort und nur für kurze Zeit oder über mehrere Stunden bis zum Abschluß der Virusreifung. Späte mRNS codiert späte, vor allem Strukturproteine (MAHR und ROBERTS, 1984) . Die molekularen Mechanismen für das Umschalten von früher auf späte Gen - Expression sind noch unbekannt (WITTEK

et al., 1984b) . PENNINGTON fand 1974 in virusinfizierten Zellen 80 virusinduzierte Polypeptide, davon 30 frühe, präreplikative Polypeptide vor, und 50 späte, postreplikative, nach Beginn der DNS - Synthese. Die Synthese der meisten präreplikativen Polypeptide wird am Höhepunkt der DNS - Replikation abgeschaltet, während die meisten der postreplikativen Polypeptide über längere Zeit synthetisiert werden. Die meisten frühen Proteine wirken als Enzyme der Nukleinsäuresynthese, nur einige werden nach Modifikation in das Virion eingebaut. Der Großteil später Polypeptide wird ebenfalls verändert, bevor er zum Einbau kommt. Dies kann durch Spaltung höhermolekularer Strukturproteinvorstufen (Precursor - Proteine) , Glykosylierung oder Phosphorylierung geschehen (SILVER und DALES, 1982) . PENNINGTON (1974) stellte in der SDS - PAGE das Verschwinden von elf Strukturproteinbanden und das Erscheinen von sieben neuen Strukturproteinen während der Virusreifung fest. In jüngster Zeit wurden zahlreiche frühe Virusproteine durch Kartierung der codierenden DNS - Abschnitte identifiziert (Lit. bei MAHR und ROBERTS, 1984) , dagegen sind die Basensequenzen für Strukturproteine noch weniger untersucht (WITTEK et al., 1984b) . Für eines der wichtigsten Strukturproteine der Hülle, das basische Phosphoprotein mit 11 KD (HILLER und WEBER, 1982) wurde 1984 (WITTEK et al., 1984b) die Basensequenz ermittelt. Ebenfalls 1984 kartierten diese Autoren das Gen für die beiden Hauptkomponenten des Core mit MG von 58 und 62 KD (WITTEK et al., 1984a) . Diese beiden Polypeptide werden als Precursor - Proteine (MOSS und ROSENBLUM, 1973) mit 86 und 66 KD translatiert und durch Spaltung modifiziert. Nach SILVER und DALES (1982) dagegen werden die Core - Precursor 94 und 65 KD nach der Translation in mehrere kleinere Coreproteine mit 62, 60, 23, 18,5 und 18 KD gespalten.

2.4 Antigene von Orthopockenviren

Die Antigenstruktur der großen Pockenviren ist aufgrund der vielfältigen Strukturelemente sehr komplex. Poly - klonale Antikörper in Immunseren sind somit gegen eine Vielzahl von antigenen Determinanten unterschiedlicher Präferenzen (Immunodominanz) gerichtet.

2.4.1 Lösliche Antigene

Lösliche Antigene sind nicht an das Virion direkt gebunden, sondern in Extrakten bzw. Überständen homogenisierter virusinfizierter Zellen nachweisbar. Man nimmt an, daß lösliche Antigene überschüssiges Antigenmaterial darstellen, das nicht in Virionen eingebaut wurde. Nicht alle löslichen Antigene sind auch im Virion nachweisbar (MAYR et al., 1972) . Im Doppel - Agargel - Diffusionstest fanden MARQUARDT et al. (1965) acht präzipitierende lösliche Antigene von VV. WESTWOOD et al. stellten dagegen im selben Jahr 17 Präzipitationslinien im Agargel - Diffusionstest fest, wenn Immunseren gegen Virus - Zell - extrakte von VV untersucht wurden. Fünf der gefundenen Komponenten waren hitzelabil (als L - Antigene bezeichnet) und sechs hitzestabil (S - Antigene) .

Bereits 1942 gewannen SMADEL et al. durch Extraktion von Viruspartikeln mit Natronlauge ein allen Pockenvirusgenera gemeinsames Nukleoprotein - Antigen, das aus der gesamten DNS und 50% der Proteinmasse der Virionen bestand.

APPLEYARD et al. (1964a und 1964b) konnten mit löslichem VV - Antigen, das sie durch hochtourige Zentrifugation und Filtration von virusinfizierten Zellen gewonnen hatten, Kaninchen immunisieren. Dieser virusfreie Zellextrakt erzeugte eine vollständige Immunität gegen VV - Infektionen und eine teilweise gegen Kaninchenpocken. McCRAE und PENNINGTON (1978) stellten fest, daß virus - infizierte Zellen Polypeptide in die Umgebung freisetzen,

bzw. aktiv sezernieren. Diese stimmen mit in der Zytoplasmamembran infizierter Zellen lokalisierten virus-spezifischen Proteinen überein (MALLON und HOLWCZAK, 1985). Auch das virale Haemagglutinin ist als lösliches Antigen nachweisbar (WEINTRAUB und DALES, 1974).

2.4.2 Zellmembran - assoziierte virusspezifische Antigene

Nach der Virusinfektion der Zelle finden an der Zytoplasmamembran strukturelle und funktionelle Modifikationen statt. An den Zelloberflächen erscheinen Mikrovilli, die Zellmembran ändert ihre Elektrolytleitfähigkeit und ihre Phospholipidzusammensetzung. Letzteres wird im Zusammenhang mit der Hemmung des Zellstoffwechsels durch das Virus gesehen (Lit. bei MALLON und HOLOWCZAK, 1985). Die an der Zelloberfläche auftretenden Antigene können nach ihrer Herkunft unterschieden werden :

- (1) Bei der Virus - Zell - Fusion werden Bestandteile der Virushülle in die Zellmembran eingebaut, diese wiederum werden z.T. durch membranständige Proteasen aufgespalten (ICHIHASHI und OIE, 1980).
- (2) Frühe, präreplikative Proteine werden vom Zellinneren an die Zytoplasmamembran transferiert (CHANG und METZ, 1976). Eines dieser frühen, virusinduzierten zellmembran - assoziierten Antigene wurde von IKUTA et al. (1980) als " Early Cell Surface Antigen " (ECSA) beschrieben. Dieses wird von VV bzw. Kuhpockenvirus noch vor Beginn der DNS - Replikation induziert, weist ein MG von 40 bzw. 43 KD auf und reagiert mit beiden Virusarten kreuz.
- (3) Es erscheinen postreplikativ Strukturproteine an der Zellmembran. Ein Beispiel für ein derartiges spätes Protein ist das virale Haemagglutinin (WEINTRAUB und DALES, 1974). MALLON UND HOLOWCZAK (1985) identifizierten zwei Stunden p.inf. vier frühe Protein viralen Ursprungs in der Zytoplasmamembran. Ein 32 - 34 KD -

Polypeptid, das vor, während und nach der DNS - Replikation synthetisiert wird und sechs postreplikative Polypeptide 12 Stunden p.inf.

Zelloberflächen - Antigene spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunreaktion, da sie die Aktivierung zytotoxischer T - Lymphozyten induzieren (MALLON et al., 1985) .

2.4.3 Virusgebundene Antigene

Das breite Spektrum antigenen Determinanten auf intakten Pockenviruspartikeln ist nur unvollständig untersucht. APPLEYARD et al. (1971) stellten fest, daß bei der Vermehrung von Kaninchenpockenvirus der Hauptanteil in - fektioser Partikel in der Zelle verbleibt und nur ein sehr geringer Anteil aus der Zelle ausgeschleust wird. Extrazelluläre Partikel (Extracellular enveloped virus, EEV) erhalten an zytoplasmatischen Membranstrukturen oder an der Zellmembran eine Hülle. Dagegen bleiben intra - zellulär liegende, nicht ausgeschleuste Virionen (Intra - cellular naked virus, INV) unbehüllt. INV unterscheiden sich immunologisch stark von EEV. Oben genannte Autoren stellten fest, daß inaktivierte Vakzinen nur neutrali - sierende Antikörper gegen INV induzieren, während nach Impfung mit Lebendimpfstoffen von VV INV und EEV neutra - lisiert werden. Nach PAYNE (1980) stellt EEV nur 1% des Gesamtvirus dar, beide Formen sind allerdings in - fektios und vermehrungsfähig. Bei der Virusreinigung sind sie durch ihre unterschiedliche Dichte im Caesiumchlorid - Gradienten trennbar (INV = $1,272 \text{ g/cm}^3$; EEV = $1,232 \text{ g/cm}^3$).

Mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäuren und Zucker konnte PAYNE (1978) ein Hüllprotein mit 37 KD und neun Glykoproteine mit MG von 210, 110, 89 und 42 KD und mehrere kleine Glykopolypeptide im Bereich von 23 - 20 KD

in der Hülle von EEV identifizieren. Das 89 KD - Glyko - protein wurde als virales Haemagglutinin bestimmt, da es nur in Zellmembranen virusinfizierter Zellen und Virushüllen (EEV) isoliert werden konnte und in vitro Hühnererythrozyten adsorbierte (PAYNE, 1979) . HILLER et al. (1981b) untersuchten die Eigenschaften von EEV und INV mit IMCBH, einer Substanz, die die Virusfrei - setzung aus der Zelle hemmt. In der SDS - PAGE wurde bei EEV ein zusätzliches Polypeptid mit 37 KD, das 5 - 7% der Proteinmasse darstellt, gefunden. Durch radioaktive Markierung beider Virusformen mit Laktoperoxidase wurde bei INV ein zusätzliches 13 KD - Polypeptid festgestellt. EEV enthält fast doppelt so viele Phospholipide wie INV. Mit monospezifischen Immunseren gegen ein frühes 31 KD - Protein, das in INV und EEV vorkommt, und gegen das nur in EEV vorliegende 37 KD - Protein, wurde die Virusfrei - setzung aus der Zelle mit Immunofluoreszenztechniken un - tersucht. Unreife Viruspartikel liegen in den Viroplasma - zonen, während Partikel, die das 37 KD - Protein enthalten, an der Zellperipherie zu finden sind. An der Zellober - fläche bilden sich Mikrovilli, die reife Virionen ent - halten (Lit. bei HILLER et al., 1981b) . Diese Zell - membranveränderungen entstehen durch zytoplasmatische virushaltige Vesikel, die an die Peripherie wandern und mit der Zellmembran verschmelzen. Dabei entsteht behülltes Virus (EEV) . Restliches Virus, reif aber ohne Hülle, wird bei der Zelllysis freigesetzt.

Eines der am besten untersuchten viralen Antigene von VV ist das Haemagglutinin (Lit. bei MALLON und HOLOWCZAK, 1985) . Die Untersuchung des Haemagglutinins ist dadurch erleichtert, daß Haemagglutinin - negative Vaccinia - Stämme (IHD - W - Stamm, ICHIHASHI und DALES, 1971; DIs - Stamm, TAGAYA et al., 1961) existieren und zu direkten Vergleichen herangezogen werden können. SMITH et al. (1973) nahmen an, daß das Haemagglutinin aus einem Phospholipoproteinkomplex besteht; dabei adsorbiert

das Phospholipid Hühnererythrozyten, während das Protein die antigene Determinante darstellt. WEINTRAUB und DALES (1974) bewiesen den Glykoprotein - Charakter des Haem - agglutinins, bestimmten allerdings das MG des in der Virushülle lokalisierten späten Strukturproteins nicht. ICHIHASHI (1977) fand einen aus Glykoproteinen bestehenden Komplex (MG 150, 34 und 10 KD) mit haemagglutinierenden Eigenschaften in Zellmembranen virusinfizierter Zellen. IKUTA et al. (1979) konnten zwei Glykoproteine mit 41 und 85 KD mit Haemagglutinin - Charakter aus VV und Kuhpockenvirus isolieren. DALES et al. (1983) isolierten gegen das virale Hämagglutinin gerichtete Hybridoma - Zellklone. Die produzierten monoklonalen Antikörper reagierten in der Immunofluoreszenz und im Western - Immunoblotting ausschließlich mit dem 85 KD - Glykoprotein auf Zellmembranen virusinfizierter (HA⁺ - Vaccinia - Stamm IHD - J) Zellen. Nach DALES und OLDSTONE (1982) spielt das Haemagglutinin in Zellmembranen eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunabwehr, da dieses 85 KD - Glykoprotein mit dem Haupt - Histokompatibilitätsanti - gen einen Komplex bildet, der zytotoxischen T - Lympho - zyten als Ziel dient. Virusinfizierte Zellen werden somit erkannt und lysiert.

Noch weitgehend unklar ist, welches bzw. welche anti - genen Determinanten für die Virusneutralisation verant - wortlich sind, da man deren molekulare Mechanismen eben - falls noch nicht kennt. Es ist fraglich wie viele Anti - körper zur Neutralisation eines Viruspartikels nötig sind, wie die gegen zahlreiche antigene Determinanten gerichteten Antikörper polyklonaler Immunseren mitein - ander in Interaktion treten und welche Rolle die Nicht - Immunglobulinkomponenten des Serums (Komplement, Op - sonin, Lysine u.a.) bei der Virus - Antikörperreaktion spielen (DIMMOCK, 1984) . Neutralisierende Antikörper induzierende Antigene wurden zuerst vor allem auf den Oberflächen intakter Virionen gesucht.

Das von STERN und DALES 1976a isolierte Oberflächen - tubulusprotein mit 58 KD induziert bei der Immunisierung von Kaninchen neutralisierende Antikörper. Der genaue Neutralisationsmechanismus von monospezifischen anti - 58 KD Immunseren ist unbekannt, eine Beeinflussung der Virushaftung an der Zelle wird vermutet.

Eine ebenfalls an der Virusoberfläche liegende Komponente ist das basische Phosphoprotein mit 11 KD (HILLER und WEBER, 1982) . Immunseren gegen isoliertes 11 KD - Protein markierten im Western - Immunoblot selektiv diesen Antigen; mit der Immunoferitinmethode wurde die Virusoberfläche angefärbt. Anti - 11 KD Immunserum neutralisierte VV im Plaquereduktionstest, wobei der genaue Mechanismus ebenfalls unklar blieb. Das untersuchte Protein ist ein spätes, postreplikativ phosphoryliertes Strukturprotein, das während der Virusreifung mit den Core - Precursoren 94 und 65 KD (SILVER und DALES, 1982) der Hauptcoreproteine 62 und 58 KD einen Komplex bildet und eine starke Affinität an die zytoplasmatischen Aktinfilamente (Mikrotubuli, Zytoskelett) aufweist. 1985 beschrieben RODRIGUEZ et al. neutralisierende monoklonale Antikörper gegen VV. Die MAK der isolierten drei Hybridoma - Klone reagierten im ELISA stark mit Hüllproteinen (durch Extraktion gewonnen) und identifizierten im Western - Immunoblotting ein 14 KD - Hüllprotein. Eine schwächere Reaktion wurde mit den 28 und 11 KD - Proteinen festgestellt. Nach der Inkubation mit Protease V - 8 reagierten die MAK der drei Klone mit unterschiedlichen Fragmenten des 14 KD - Antigens. Die Autoren schlossen daraus, daß die MAK unterschiedliche Epitope des Antigens erkannten. Im Plaquereduktionstest neutralisierten die MAK VV; wobei gezeigt werden konnte, daß neutralisiertes Virus die Zellmembran durchdringen konnte, allerdings das Virusuncoating gehemmt war. Das 14 KD - Antigen wurde auch bei Kuh - und Kaninchenpocken - virus nachgewiesen.

Ein breites Spektrum monoklonaler Antikörper gegen Virus -

oberflächenproteine und Coreproteine erzeugten 1986 WILTON et al. Sie verglichen Mäuseimmunseren gegen VV mit monoklonalen Antikörpern in Western - Immunoblotting - Experimenten und durch Immunofluoreszenzmikroskopie. Polyklonale Antikörper in Hyperimmunseren waren vor allem gegen die Antigene mit den MG 28, 35 und 62 KD gerichtet, weitere Proteine mit MG 25, 40, 42, 60, 70 und 94 KD wurden ebenfalls identifiziert. Diese Antigene konnten sowohl in der Virushülle (35, 40, 42 KD) als auch im Core (28, 60, 62 und 94 KD) lokalisiert werden. Von 23 in der Immunofluoreszenz positiv reagierenden monoklonalen Antikörpern reagierten 13 auch im Western - Immunoblotting. 7 der 13 MAK identifizierten ein 32 KD - Polypeptid. Dieses Antigen schien bei der Immunantwort des Organismus stark B - Lymphozyten zu stimulieren, da die sieben Klone aus verschiedenen Zellfusionen stammten, also keine Subklone waren. MAK anderer Klone erkannten Antigene mit MG von 28, 35 und 85 KD, wobei die Proteine mit 32 und 28 KD im Core lagen. Die MAK waren gegen andere Antigene gerichtet, als die Antikörper in polyklonalen Seren; z.B. wurde das 32 KD - Antigen von Immunseren nicht markiert, dagegen waren nur wenige MAK gegen das prominente 35 KD - Antigen zu finden gewesen. Die MAK waren vor allem gegen innere Strukturproteine des Virions gerichtet. Die Autoren konnten damit zeigen, daß das Immunsystem innen und oberflächlich liegende Strukturproteine von VV erkennt. Auch bei der Virusreifung vorübergehend auftretende Polypeptide (Pre - cursor - Proteine; z.B. ist das 94 KD - Antigen Precursor des 62 KD - Coreproteins) wirken als Antigene. In der Immunofluoreszenz wurden sowohl reife Partikel an der Zell - peripherie als auch die Viroplasmazonen (Virus factories) markiert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß nach Vak - zination mit Lebendimpfstoffen bzw. inaktivierten Impf - stoffen von VV die Immunseren ein ähnliches Antikörper - spektrum besitzen.

TABELLE 2 : Antigene von Orthopockenviren

Antigen	Molekulargewicht (in KD)	Bemerkungen	Autoren
<u>Haemagglutinin</u>	/	Phospholipoproteinkomplex.	SMITH et al., 1973
	/	Spätes, glykosyliertes Struktur - protein in der Virushülle.	WEINTRAUF und DALES, 1974
	150; 34; 10	Komplex aus 3 Glykoproteinen, lokalisiert in der Virushülle.	ICHIHASHI, 1977
	89	Glykoprotein, das Hühnererythrozyten adsorbiert, nur bei EEV und in Zell - membranen virusinfizierter Zellen.	PAYNE, 1979
	41; 85	2 Glykoproteine mit haemaggluti - nierenden Eigenschaften.	IKUTA et al., 1980
	85	MAK gegen ein haemagglutininierendes Glykoprotein.	DALES et al., 1983
<u>Neutralisierende Antikörper</u>	58	Isoliertes Oberflächentubulusprotein.	STERN und DALES, 1976a
<u>Induzierende Antigene</u>	11	Basisches Phosphoprotein an der Virus - oberfläche.	HILLER und WEBER, 1982
	14	MAK gegen dieses Hüllprotein neutrali - sieren VV in vitro; mit 2 weiteren Pro - teinen reagieren diese abgeschwächt.	RODRIGUEZ et al., 1985
	28; 11		

3. MATERIAL und METHODEN

3.1 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

AA	- Acrylamid
Ag	- Antigen
Ak	- Antikörper
BPV	- Büffelpockenvirus
BSA	- bovines Serumalbumin
c.F.A.	- komplettes Freundesches Adjuvans
Con A	- Concanavalin A
cpE	- cytopathischer Effekt
E	- Extinktionswert
EEV	- Extrazelluläres Virus (Extracellular en - veloped virus)
ELISA	- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPV	- Elefantenpockenvirus
FC	- Fluorcarbon
FKS	- fetales Kälberserum
HAT	- Selektivmedium für Hybridoma - Zellkulturen (TAPPERT, 1981)
HEF	- Hühnerembryofibroblastenkulturen
Ig	- Immunglobulin
INV	- Intrazelluläres Virus (Intracellular naked virus)
KD	- Kilodalton (Molekulargewicht $\times 10^3$)
KID ₅₀	- 50% kulturinfektiöse Einheiten
KPV	- Kaninchenpockenvirus
KRV	- Kuhpockenvirus
MAK	- monoklonale Antikörper
2-ME	- 2 - Merkaptoethanol
MEM	- Minimal Essential Medium
MG	- Molekulargewicht
MVA	- Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (attenuiert)
NaCl-PP	- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
NC	- Nitrocellulose

NKS	- Neugeborenen Kälberserum
OPV	- Orthopockenvirus
Prot A	- Protein A
SDS	- Sodium (Natrium) - Dodecylsulfat
SDS-PAGE	- SDS - Polyacrylamidgel - Elektrophorese
TBS	- Trisgepufferte Kochsalzlösung
TW 20	- Tween 20
UpM	- Umdrehungen pro Minute
VV	- Vacciniavirus
w/v	- Gewicht pro Volumeneinheit (g/ml)

3.2 Zellkulturen

Für die Vermehrung des VV - Stammes MVA dienten aus 10 bis 11 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen gewonnene primäre HEF - Kulturen. Sie wurden nach MAYR und MUNZ (1964) durch Aussaat von 500.000 Zellen / ml in Roux - oder Penicillinflaschen angelegt. Das Anzuchtmedium bildete MEM mit 10% FKS oder 10% NKS. Dicht gewachsene Kulturen erhielten als Erhaltungsmedium MEM mit 2% FKS.

Folgende weitere Zellarten wurden eingesetzt :

Die humane Zelllinie Hela und die Affennierenzelllinie Ma - 104, kultiviert nach Standardmethoden mit MEM und 5% FKS (MAYR et al., 1974) ; die Kaninchennierenzelllinie RK - 13, kultiviert mit Medium TC 199 und 5% FKS. Allen Medien wurden Antibiotika in den üblichen Konzentrationen (100 IE Penicillin / ml und 100 µg Streptomycin / ml) zugesetzt.

3.3 Virusmaterial

3.3.1 Virusstämme

In die Untersuchungen wurden folgende Virusarten und Stämme aus der Familie Poxviridae, Genus Orthopoxvirus einbezogen :

Vacciniavirus (OPV commune) :

die Stämme MVA (MAYR et al., 1978),

Elstree (WHO - Referenzstamm, VR 862)¹,

IHD - J (NR 156)¹,

VR 235 (New York City, Department of Health)¹,

Levaditi³.

Kaninchenpockenvirus : Stamm Utrecht (KPV)².

Büffelpockenvirus : Stamm BP - 1 (BPV)³.

Kuhpockenvirus : Stamm Brighton KR - 2 (Referenzstamm, KRV)³ .

Elefantenspockenvirus : Stamm EP - 1 (EPV)³ .

Der VV - Stamm MVA lag als 576. Passage in HEF - Kulturen vor. Die Passagerate der übrigen Stämme war nicht exakt bekannt, lag aber nicht höher als 20 Zellkulturpassagen.

3.3.2 Virusvermehrung und - reinigung

MVA - Virus wurde in dicht gewachsene HEF - Kulturen mit 3×10^7 KID₅₀ pro Rouxflasche eingesät, nach Ausbildung von 90% cpE als Gesamtvirus geerntet und bei - 20°C gelagert. Die VV - Stämme Elstree, IHD, VR 325 und Levaditi sowie die Stämme von BPV, KRV und EPV wurden in Helazellen nach der gleichen Methode vermehrt. Das KPV wurde in RK - 13 Kulturen mit FKS - freiem Medium nach Einsaat von 10^7 KID₅₀ pro Rouxflasche vermehrt und nach 30 bis 36 Stunden geerntet.

Für die Herstellung von Antigen für die ELISA - Teste wurden die VV - Stämme MVA, Elstree, IHD, VR 325 und Levaditi über eine Passage in Ma - 104 Kulturen vermehrt.

Die Reinigung der OPV - Kulturvirussuspensionen erfolgte in Anlehnung an die von JOKLIK (1962) beschriebene Technik. Die bei - 20°C gelagerten Virusernten wurden aufgetaut und dabei mehrmals geschüttelt, um restliche Zellen von den Wänden der Zellkulturflaschen abzulösen. Nach kurzer Ultraschallbehandlung wurden die Virussus -

1 = bezogen von ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, USA) .

2 = Für die freundliche Überlassung danke ich Prof. Dr. R.Wittek, Lausanne.

3 = institutseigene Stammsammlung.

pensionen 90 min bei 11.000 Upm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment (Virusphase) in 1 mM Trispuffer (pH 9,0) aufgenommen. Diese Suspension wurde zu gleichen Teilen mit FC (Frigen 113; Hoechst, Frankfurt) versetzt, mit Ultraschall behandelt und dann 30 min bei 2200 g zentrifugiert. Von den drei resultierenden Phasen wurde die oberste vorsichtig abgenommen und aufbewahrt. Die mittlere und untere Phase wurden mit der gleichen Menge 1 mM Trispuffer gemischt, erneut beschallt und zentrifugiert, dann dieser Schritt wiederholt und jeweils die Überstände gewonnen. Alle Überstände aus den FC - Behandlungen wurden gepoolt. 25 ml davon wurden schließlich in der Ultrazentrifuge durch 10 ml 36%ige (w/v) Succroslösung (in 1 mM Trispuffer; Rotor SW 28, Beckman Instruments) über 90 min bei 25.000 Upm und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 mM Trispuffer resuspendiert, beschallt und auf einen vorgeformten linearen 20 - 60%igen (w/v) Succrosegredienten aufgetragen. Insgesamt 4,2 ml Zuckerlösung wurden mit 0,3 ml resuspendiertem Virus überschichtet und im Rotor SW 60 Ti 45 min bei 15.000 Upm ultrazentrifugiert. Die ausgebildeten Gradienten - Banden wurden durch seitliche Röhrchenpunktion abgezogen und der Brechungsindex dieser Fraktionen in einem Refraktometer (Zeiss) bestimmt. Schließlich wurde das gradientengereinigte Material per Ultrazentrifugation 90 min bei 35.000 Upm sedimentiert, das Pellet in 1 mM Trispuffer aufgenommen und bei - 70°C gelagert.

3.3.3 Virustitrierung

Der Gehalt an infektiösem Virus in Virusfraktionen wurde durch Titrierung in Zehnerpotenzen und Verimpfung auf Kulturröhrchen oder Zellkulturen in Mikrotiterplatten bestimmt. Verwendet wurden die Zellarten, die zur Vermehrung der einzelnen Virusstämme geeignet hatten. Je -

weils vier Kulturröhrchen wurden mit 0,1 ml einer Verdünnungsstufe beimpft und nach Zugabe von 1,5 ml ErhaltungsmEDIUM bei 37°C bebrütet. Im Mikrotitersystem wurden in die Flachbodenplatten 50 µl MEDIUM pro Nöpfchen vorgelegt und dann pro Verdünnungsstufe acht Nöpfchen mit je 50 µl beimpft. Erst abschließend wurden 100 µl Zellsuspension (500.000 Zellen / ml) eingefüllt und bei 37°C bebrütet. Die Endablesung der Titrierungsergebnisse erfolgte bei beiden Verfahren nach sechs Tagen anhand des cpE, die Titerberechnung nach KÄRBER (1931) in KID_{50} / ml.

3.3.4 Elektronenmikroskopie

An gereinigten Virusproben wurde die Reinigungseffizienz nach Negativ - Kontrastierung viruspräparierter Träger - netze im Elektronenmikroskop kontrolliert.

3.3.5 Proteingehaltsbestimmung

Der Proteingehalt gereinigter Virusproben wurde mit dem Mikro - Lowry - Verfahren ermittelt (LOWRY et al., 1951) .

3.4 Hyperimmunserum

Zwei Kaninchen wurden mit dem VV - Stamm MVA geimpft und fünfmal im Abstand von je vier Wochen revakziniert. Je Impfung wurde 1 ml FC - gereinigtes Virus, emulgiert in 1 ml c.F.A. (Behringwerke, Marburg) , intracutan und subcutan an mehreren Stellen verabreicht. Vor jeder Revakzination wurde Blut zur Kontrolle des Antikörper - status entnommen. Fünf Tage nach der letzten Impfung

(1 ml Virus ohne c.F.A.) wurden die Tiere entblutet und das Serum gewonnen.

3.5 Herstellung monoklonaler Antikörper

3.5.1 Immunisierung der Mäuse

Etwa zehn Wochen alte männliche weiße Mäuse des Inzucht - stammes BALB/c wurden nach folgendem Schema immunisiert :

Erstimpfung : 0,2 ml FC - gereinigtes Virus i.p.;

Revakzinationen : dreimal im Abstand von vier Wochen

je 0,1 ml succrosegereinigtes Virus

in 0,1 ml c.F.A. i.p.

Bei der vierten Revakzination wurden 0,15 ml succrose - gereinigtes Virus ohne c.F.A. verabreicht. Die Antikörper - bildung wurde durch wiederholte Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus verfolgt.

3.5.2 Zellfusionen

Drei bis vier Tage nach der letzten Boosterimpfung wurden den mit MVA - Virus immunisierten Mäusen die Milzen ent - nommen, zerrieben und mit Zellen der Mäusemyelomzelllinie P3 - X63 - Ag8 (KEARNEY et al., 1979) fusioniert. Die Technik war die nach TAPPERT (1981) mit Modifikationen (CZERNY, 1986) . Die fusionierten Hybridoma - Zellen wurden in HAT - Selektivmedium in Flachbodenplatten aus - gesät und nach sieben und vierzehn Tagen jeweils das Kulturmedium erneuert. Aus Vertiefungen mit Koloniewachs - tum wurden zwölf Stunden nach dem letzten Mediumwechsel die Zellkulturüberstände abgenommen und im ELISA auf virusspezifische Antikörper untersucht. Kolonien, die Ak sezernierten, wurden subkultiviert und mit der Limiting Dilution - Technik kloniert (HUEBERT, 1985) .

Unter wöchentlicher Ak - Kontrolle im ELISA wurden Ak - produzierende Klone weitervermehrt, schließlich mit einer Zellzahl von ca. 10^7 / ml in MEM mit 10% FKS und 7,5% DMSO (Dimethylsulfoxid; Serva , Heidelberg) als Konservierungsmedium aufgenommen, in Ampullen abgefüllt und bei - 196°C konserviert. Um FKS - freie Ak - haltige Hybridoma - Zellkulturüberstände zu gewinnen, wurde dicht gewachsenen subkultivierten Klonen das Erhaltungs - medium entfernt und durch reines MEM ersetzt. Vier Stunden später wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min bei 800 g) von den Überständen getrennt, diese im ELISA untersucht und bei - 20°C aufbewahrt.

3.5.3 Gewinnung von Mäuseascites

Um die Konzentrationen an MAK zu erhöhen, wurden Ak - positive klonierte Hybridoma - Zellen in BALB/c - Mäusen vermehrt. Erwachsene männliche Mäuse erhielten zunächst 1 ml Pristane (2, 6, 10, 14 - Tetramethyl - Pentadecan; Aldrich, Steinheim) i.p. als Immunsuppressivum. Zwei bis sechs Wochen später wurden ca. 10^7 Hybridoma - Zellen je Maus i.p. appliziert. Nach etwa zehn Tagen erfolgte die Gewinnung der Ak - haltigen Asciten über wiederholte Punktionen der Bauchhöhle. Die Asciten wurden zweimal bei 2.200 g 30 min zentrifugiert, der Überstand in kleinen Portionen abgefüllt und bei - 20°C gelagert.

3.6. Untersuchung von Immunseren und Hybridoma - Zellkulturproben auf Antikörper

3.6.1 Neutralisationstest

Er wurde als Serumneutralisationstest in Mikrotiter - zellkulturplatten durchgeführt. Die Seren und Mäuse -

asciten wurden vor dem Test 30 min bei 56°C inaktiviert. Für jede Probe wurden drei Verdünnungsreihen (Faktor 2, Endvolumen 50 µl im MEM) auf der Platte angelegt, je 50 µl Virus, eingestellt auf 100 KID₅₀ / 50 µl dazugegeben, die Platten geschüttelt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden ca. 50.000 primäre HEF - Zellen (in MEM mit 10% FKS) pro Vertiefung eingefüllt. In der Endauswertung nach sieben Tagen wurde nur eine vollständige Hemmung des Viruswachstums als positive Neutralisation gewertet. Die Berechnung des neutralisierenden Serumtiters erfolgte nach BEHRENS und KAERBER (zit. in MAYR et al., 1977) als ND₅₀.

3.6.2 ELISA - Technik

Ein indirekter ELISA wurde als Screening - Test zum Nachweis von Ak in Hybridoma - Zellkulturüberständen eingesetzt. OPV - Antigene wurden an Mikrotestplatten gekoppelt, die Lochreihen mit den zu untersuchenden Proben inkubiert und die Ag - Ak - Bindung mit einem enzymgekoppelten anti - Spezies Globulin markiert. Die Sichtbarmachung gebundener Ak erfolgte mit der photometrisch auswertbaren Enzym - Substrat - Reaktion.

Die Herstellung von Pufferlösungen, die Inkubationen und Waschschritte erfolgten in Anlehnung an die Methode von BACHMANN (1979) für den Rotavirusnachweis in Kälber - kot wie folgt :

Als Antigene dienten die FC - gereinigten VV - Stämme MVA, Elstree, IHD, VR 325, Levaditi und der KPV - Stamm. BPV, KRV und EPV wurden als Kulturvirussuspensionen verwendet. Eine mit gereinigtem Orf - Virus (Parapoxvirus ovis) beschichtete Platte diente als Vergleichskontrolle, sowie mit 20% FKS beschichtete Platten als negative Kontrollen. Antigenverdünnungen wurden in Coating - Puffer (0,05 M Carbonat - Bicarbonatpuffer pH 9,6) hergestellt und zu je 100 µl in ELISA - Platten (Nunc, Wiesbaden)

pipettiert. Zur Antigenbindung wurden die Platten für drei Stunden bei 37°C inkubiert und dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Beschichtete Platten wurden nur kurze Zeit bei 4°C gelagert.

Vor der Verwendung wurden antigenbeschichtete Platten trockengeschüttelt und mit 20% FKS bzw. 1% BSA (Serva, Heidelberg) in NaCl - PP inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen für alle Schritte 60 min bei 37°C; nach jeder Phase wurden die Platten dreimal mit NaCl - PP (unter Zusatz von 0,05% Tween 20) gewaschen und gründlich trockengeschüttelt. Alle Reagentien wurden in Mengen von 100 µl je Vertiefung eingefüllt; die zu untersuchenden Ak - Proben mit Faktor 2 auf der Platte verdünnt. Proben von Mäusen, wie auch Hybridoma - Zellkulturüberstände wurden mit Kaninchen - anti - Maus Meerrettichperoxidase - Konjugat (Dako Immunoglobulins, Dänemark) überschichtet, solche von Kaninchen (Immunseren) mit peroxidasekonjugiertem anti - Kaninchen Immunglobulin der Ziege (Sigma, München) . Die Konjugate wurden 1 : 1.000 in NaCl - PP mit 5% FKS verdünnt. Als Enzymsubstrat diente Ortho - Phenylendiamin (OPD; Sigma, München) in einer Konzentration von 3 mM (0,5 g/l) in 0,1 M Na - Citrat - Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,005% H₂O₂. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte photometrisch nach 30 min bei Zimmertemperatur mit dem Multi - scan - Photometer (Flow Laboratories) bei 450 nm Wellenlänge. Der Meßbereich des Gerätes umfaßte Extinktionswerte von 0,000 bis 2,000.

3.6.3 Bestimmung der Immunglobulin - Subklassen im ELISA

Die Immunglobulin - Subklasse monoklonaler Ak (in Hybridoma - Zellkulturüberständen und Mäuseasciten) wurde ebenfalls mittels ELISA untersucht.

ELISA mit anti - Isotyp Konjugaten :

Als Enzym - Konjugate wurden spezifische, peroxidase - gekoppelte Kaninchenantikörper gegen die Mäuseimmunglobuline IgA, IgG und IgM (Bionetics, Cat. 8809 - 01, - 02, - 03; USA) verwendet. Das anti - IgM Konjugat wurde 1 : 300, die anti - IgA und - IgG Konjugate 1 : 100 verdünnt. Alle Inkubations - und Waschschriffe erfolgten wie oben beschrieben.

ELISA mit anti - Isotyp Immunseren :

Zum Nachweis des Isotyps der MAK wurde ein subklassen - spezifischer Kaninchen - anti - Mäuseimmunglobulin Ak eingesetzt. Die Antiseren (Miles, England) wurden 1 : 400 bzw. 1 : 1.600 (anti - IgG_{2a}) in NaCl - PP verdünnt und 60 min bei 37°C an die zu untersuchenden MAK auf der Platte gebunden. Zum Nachweis der anti - Isotyp Antikörper diente das anti - Kaninchen Konjugat (vgl. 3.6.2) .

3.7 Reinigung monoklonaler Antikörper

3.7.1 Protein A - Affinitätschromatographie

Sie diente zur Abtrennung von IgG - Molekülen aus Mäuse - asciten. Je 1 ml Mäuseascites wurden auf eine Chromatographie säule aufgetragen (Füllmaterial : Sepharose - kügelchen, an die Protein A gekoppelt ist. Protein A - Sepharose 4B; Pharmacia, Freiburg) . Die nicht gebundenen Ascitesbestandteile wurden mit Tris - HCl - Puffer (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl pH 8,4) ausgewaschen und gebundene IgG mit Elutionspuffer pH 3,0 (0,1 M Glycin - puffer) eluiert. Säulenpräparation, Herstellung der Wasch - und Elutionspuffer sowie die Auswahl der Gerätschaften entsprachen der bei HUEBERT (1985) beschriebenen Technik.

3.7.2 Concanavalin A - Affinitätschromatographie

Die Con A - Affinitätschromatographie wurde zur selektiven Gewinnung von zuckerhaltigen IgM - Antikörpern eingesetzt. Für die Con A - Chromatographiesäule (Concanavalin A - Sepharose 4B; Pharmacia, Freiburg) wurden gleiche Arbeitsbedingungen (vgl. 3.7.1) gewählt; als Waschpuffer diente NaCl - PP (pH 7,5), zur Elution dagegen NaCl - PP mit Zusatz von 10 mM α - Methyl - D - Mannosid (Sigma, München) .

3.8 SDS - Polyacrylamidgel - Elektrophorese

3.8.1 Trennung der Proteine

Für die elektrophoretische Auftrennung viraler Proteine wurde das diskontinuierliche, denaturierende und reduzierende Verfahren nach LAEMMLI (1970) gewählt. Die Auswahl der Materialien und Pufferlösungen erfolgte nach den Anleitungen von HUEBERT (1985) für die Elektrophorese von Antikörperproben.

50 μ l der in Probenpuffer vorbereiteten zuckergereinigten Virussuspensionen wurden nach dreiminütigem Kochen im Wasserbad in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Proteinkonzentrationen waren auf 240 μ g/ ml eingestellt. Die Elektrophorese lief 16 Stunden bei 50 V und 25 - 30 mA; für Gele höherer Konzentrationen als 10% AA wurde die Spannung um 5 - 10 V erhöht. Der Lauf wurde dann bei Ankunft der Front am Sockelgel beendet. Für die Darstellung viraler Proteine wurden Gele verschiedener AA - Konzentrationen gewählt (7,5%, 10%, 12,5%), bzw. Gradientengele gegossen. Die Gradientengele mit 20 - 5% bzw. 15 - 5% AA wurden nach HANES und RICKWOOD (1981) hergestellt.

Gereinigte MAK wurden in 10%igen Gelen ohne Reduktion

(Probenpuffer ohne 2-ME) untersucht, um die durch Disulfidbrücken stabilisierten schweren und leichten Ketten der Immunglobuline nicht zu dissoziieren. Um Gele unterschiedlicher Konzentrationen vergleichen zu können, wie auch zur Identifizierung von Virusproteinen anhand ihrer Molekulargewichte wurden bei jedem Lauf zwei Bahnen mit Molekulargewichtsstandards (MW SDS - 70L Kit und MW SDS - 200 Kit ; Sigma, München) mitgeführt. Die Standards wurden in Konzentrationen von 12 µg Protein / Tasche in Probenpuffer wie üblich vorbereitet.

3.8.2 Silberfärbung

Die Proteinbanden in den SDS - Gelen wurden mit einer Silberfärbung, modifiziert nach MERRILL et al. (1981) angefärbt. Die Herstellung der Färb- und Fixierlösungen sowie Inkubationen und Waschschriffe erfolgten nach der Beschreibung von KRAUSS (1985) zur Anfärbung von Rotavirus - RNS in SDS - Gelen.

3.9 Elektrophoretik (Western Blotting)

3.9.1 Transfer auf Nitrocellulose - Membranen

Für den Transfer der zu untersuchenden Virusproteine vom SDS - Gel auf eine NC - Membran mit 0,45 µm Porengröße (NC - Membran BA 85; Schleicher & Schüll, Dassel) diente das Western Blotting - Verfahren nach TOWBIN et al. (1979) .

Der Transfer erfolgte unter Anlegen von Spannung in einer Transphor - Elektrophoretikammer (LKB, München) mit dem von o.g. Autoren vorgeschlagenen methanolhaltigen Tris - Glycinpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin pH 8,3 mit

20 % Methanol) .

Während das Gel dreimal 10 min in Transferpuffer äqui -
libriert wurde, um SDS auszuwaschen, wurde die Transfer -
kassette vorbereitet : In einer Wanne mit ca. 500 ml
Transferpuffer wurden auf den Kassettenboden der befeuch -
tete Kunststoffschwamm und zwei Lagen passend zugeschnit -
tenes Filterpapier (Whatman 3 MM; Whatman, England)
gelegt, das Gel dann nach Entfernen des Sockelgels auf
dieser Unterlage und darüber eine NC - Folie ohne Luft -
blasen plaziert. Eine Doppellage Filterpapier und der
Kassettendeckel bildeten den Abschluß des " Sandwiches ".
Die geschlossene Kassette wurde aufrecht in die puffer -
gefüllte Transferkammer gestellt, wobei das Gel auf der
Kathoden - und die NC auf der Anodenseite zu plazieren
waren. Die angelegte Spannung betrug 100 V bei 60 - minü -
tiger Elektrophoresedauer.

3.9.2 Amidoschwarzfärbung von NC - Membranen

Färbelösung : Amidoschwarz 0,5% (w/v) , (Merck, Darm -
stadt) in 45% Methanol und 5% Eisessig
in Aqua dest.

Entfärbelösung : 45% Methanol und 5% Eisessig in Aqua dest.
Die NC - Membran wurde nach dem Blotten sofort in Amido -
schwarzlösung 10 min lang gefärbt, dann 5 min lang in
Aqua dest. und anschließend zweimal 10 min in Entfärbe -
lösung entfärbt, bis der Hintergrund hell erschien. Trock -
nen zwischen Filterpapier bildete den Abschluß.

3.10 Immunoblotting

Die Antigenspezifität von Ak in Kaninchen - und Mäuse -
hyperimmunseren sowie von MAK wurde im Immunoblotting -
Experiment untersucht.

Das auf einer Matrix (z.B. NC - Membran) fixierte Ag wird mit der zu untersuchenden Ak - Probe inkubiert, dann die Matrix gewaschen und anschließend mit Enzym - gekoppeltem anti - Spezies Immunglobulin überschichtet. Nach wiederholtem Waschen erfolgt die Sichtbarmachung einer stattgefundenen Ag - Ak - Reaktion mit einer Enzym - Substrat - Reaktion. Vor der Inkubation mit der Ak - Lösung werden alle freien Bindungsstellen auf der Membran abgeblockt, um hohe Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

Einzelschritte beim Immunoblot :

Als Waschpuffer und Puffer für alle verwendeten Lösungen diente TBS, ein Tris - NaCl - Puffer pH 7,5 (20 mM Tris, 500 mM NaCl) . Alle Inkubationen und Waschschriffe fanden bei Zimmertemperatur auf dem Schüttler statt.

Die NC - Membran wurde nach dem Transfer 60 min in TBS mit 3% Gelatine (w/v; Biorad, München) geblockt. Alternativ dazu wurden TBS - Lösungen mit 20% FKS, 20% NKS oder 5% (w/v) BSA verwendet. Nach zweimaligem Waschen (10 min) in TBS mit Zusatz von 0,05% TW 20 wurden die Ak - Proben, suspendiert in TBS mit 0,05% TW 20 und 1% Gelatine (bzw. 5% FKS, 5% NKS, 1% BSA) , aufgetragen. Mäuseseren wurden 1 : 250, Kaninchenseren 1 : 150 und MAK variierend 1 : 20 bis 1 : 1.000 verdünnt. Die Reaktionszeit betrug 120 min bei Zimmertemperatur mit anschließender Stabilisierung über Nacht im Kühlschrank. Danach wurde dreimal 10 min in TBS mit TW 20 gewaschen. Die Konjugate (vgl. 3.6.2) wurden 1 : 250 in TBS mit TW 20 und 1% Gelatine (bzw. s.o.) verdünnt und 90 min inkubiert. Dann wurde zweimal 10 min mit TBS mit TW 20 und zweimal 10 min mit TBS ohne TW 20 gewaschen. Für die Substratreaktion wurden zwei Stammlösungen vorbereitet :

Lösung A : 100 ml TBS + 60 μ l 30% H_2O_2 (Endkonzentration 0,015%) ;

Lösung B : 20 ml Methanol, eiskalt, + 60 mg HRP - Color

Development - Reagent (Biorad, München) .

Die Lösung B wurde erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sofort zusammen mit Lösung A auf die NC - Membran gegeben. Nach einer Reaktionszeit von maximal 20 min wurde die Farbreaktion mit Aqua dest. gestoppt und das fertige Blot zwischen Filterpapier getrocknet. Die Aufbewahrung gefärbter Blots erfolgte lichtgeschützt und kühl (Kühltisch) .

Die Ak - Lösung und die Konjugatlösung wurden so bemessen, daß die NC - Matrix gerade bedeckt war. Nach TOWBIN et al. (1979) sind mindestens 3 ml / 100 mm² NC nötig. Die angegebene Menge der Substratlösung war ausreichend für eine Membran in der Größe eines Gels (ca. 12 x 18 cm) .

4. E R G E B N I S S E

4.1 Optimierung des ELISA zum Nachweis von OPV - Antikörpern

Vor den Prüfungen an Seren und anderen Proben auf OPV - Antikörper waren die optimalen Antigenverdünnungen zur Beschichtung der ELISA - Platten im Schachbrettversuch zu ermitteln. Von den FC - gereinigten VV - Stämmen MVA, Elstree, IHD, VR 325 und Levaditi sowie von KPV wurden in Coatingpuffer Verdünnungsreihen (1 : 20 bis 1 : 320) angelegt und pro Verdünnungsstufe drei Reihen zu je acht Vertiefungen der Mikrotestplatten gefüllt. Für jedes Antigen stand ein homologes Mäusehyperimmunserum zur Verfügung; als negative Kontrolle diente Mäuse - Normal - serum. Jede Antigenverdünnungsstufe wurde in je einer Reihe mit Immunserum, Normalserum und NaCl - PP untersucht. Die Seren wurden in log 2 - Schritten (Ausgangsverdünnung 1 : 50) auf der Platte verdünnt. Für die spätere Beschichtung der ELISA - Platten, die zur Untersuchung auf MAK vorgesehen waren, wurde diejenige Ag - Konzentration gewählt, die im Schachbrettversuch mit der niedrigsten Verdünnungsstufe des Immunserums (1 : 50) maximale Extinktionswerte bei minimalen Extinktionswerten ($< 0,1$) mit dem Kontrollserum gezeigt hatte.

Die Proteinkonzentrationen der Antigenverdünnungen für die Plattenbeschichtung wurden im Mikro - Lowry - Verfahren bestimmt. Sie betrugen durchschnittlich 1,57 mg Protein / ml (0,825 - 1,90 mg / ml) .

Die ungereinigten Virussuspensionen von BPV, EPV und KRV wurden ohne Vorprüfung im Schachbrettversuch in Coatingpuffer 1 : 5 verdünnt zur Plattenbeschichtung verwendet. Die mittleren Proteinkonzentrationen betrugen 20,4 mg / ml (16,4 - 25,0 mg / ml) .

Bei jedem ELISA wurde eine mit 1% BSA oder 20% FKS (in NaCl - PP) beschichtete Platte als negative Kontrolle mitgeführt.

4.2 Titration von Serumantikörpern in ELISA und Neutralisationstest

Die Antikörperbildung bei den Immunisierungen von Kaninchen und Mäusen mit OPV wurde im ELISA und Neutralisationstest vergleichend untersucht.

4.2.1 MVA - Antikörper in Kaninchenhyperimmunseren

Vor der Immunisierung mit dem VV - Stamm MVA wurde den Kaninchen Blut für die Gewinnung von Ak - negativem Serum entnommen.

Durchführung des ELISA :

Die Negativ - Seren reagierten im ELISA nicht auf den Kontrollplatten, jedoch auf den MVA - Platten bis zur Verdünnungsstufe 1 : 200 mit Extinktionswerten um 0,15. Die Immunseren banden unabhängig vom Immunisierungsstatus der Kaninchen mit Kontrollplatten bis zur Verdünnungsstufe 1 : 400 und Extinktionswerten von 0,1 - 0,15. Zwischen BSA - und FKS - beschichteten Kontrollplatten wurden keine Unterschiede beobachtet. Als Grenzwert für ELISA - positiv reagierende Kaninchenseren wurde der Extinktionswert 0,1 festgesetzt, wenn die Verdünnung höher als 1 : 400 war; als Ak - Titer wurde die Verdünnungsstufe gewertet, die einen Extinktionswert von über 0,1 aufwies. Die im Verlauf der Immunisierung der Kaninchen mit MVA - Virus ermittelten Ak - Titer sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Neutralisationstest :

Die Kontrollseren neutralisierten das MVA - Virus nicht und wurden bei allen Testen mitgeführt.

Die neutralisierenden Serum - Ak stiegen langsam und kontinuierlich mit jeder Revakzination an und erreichten einen durchschnittlichen Titer von 1 : 727. Im ELISA resultierten

wesentlich höhere Titer als im Neutralisationstest. Sie stiegen bis zur vierten Impfung auf 1 : 204.800 an und blieben dann konstant.

TABELLE 3 : Antikörperbildung der Kaninchen im Verlauf der Immunisierung mit MVA - Virus.

Impfungen	Titer im N - Test (1 :)	Titer im ELISA (1 :)
1.Immunisierung	24	3.200
2. "	40	12.800
3. "	128	51.200
4. "	256	204.800
5. "	384	204.800
6. "	727	204.800
Kontrollserum	negativ	negativ

4.2.2 Antikörper in Mäusehyperimmunseren

Mit MVA - Virus hyperimmunisierte Mäuse, deren Milzen für Zellfusionen dienten, wurden auf Serumantikörper untersucht. Seren nicht immunisierter BALB/c Mäuse bildeten die negativen Kontrollen für ELISA und N - Test.

Im ELISA reagierten die Kontrollseren in Verdünnungen über 1 : 100 weder mit den Kontrollplatten noch mit MVA - Platten. Die Immunseren jedoch zeigten mit Kontrollplatten bis zur Verdünnungsstufe 1 : 1.000 Reaktionen bei Extinktionswerten über 0,1. Ein Serum wurde deshalb als positiv gewertet, wenn die Extinktionswerte bei Verdünnungen über 1 : 1.000 $\geq$ 0,1 lagen. Als spezifischer ELISA - Titer zählte wiederum die höchste Serumverdünnung mit einer Extinktion $\geq$ 0,1. Die Seren hyperimmunser Mäuse neutralisierten bis durchschnittlich 1 : 128 bei ELISA - Titern von über 1 : 128.000.

4.3 Monoklonale Antikörper gegen den VV - Stamm MVA

4.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper und Untersuchung im ELISA

Nach der Fusion von Milzzellen hyperimmunisierter Mäuse mit Myelomzellen wuchsen innerhalb von neun Tagen bei 200 von 672 angesetzten Vertiefungen auf Mikrotestplatten Zell - Kolonien aus (29,7%). Sie wurden fortlaufend per ELISA auf Ak - Sekretion kontrolliert.

ELISA - Technik :

Zwölf Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurden aus den koloniehaltigen Vertiefungen der Mikro - Zellkultur - platten Proben der Kulturmedien abgenommen (50 µl von 200 µl Gesamtvolumen) und auf vorbereitete MVA - sowie Kontrollplatten (Vorlage 50 µl NaCl - PP) übertragen. Als positive Kontrollprobe diente Mäusehyperimmunserum, als negative Medium aus Vertiefungen ohne Koloniewachstum. Die Hybridoma - Zellkulturmedien reagierten auf den negativen Kontrollplatten nicht; der Positiv - Grenzwert für Mediumverdünnungsstufen von 1 : 2 wurde demnach auf Extinktionswerte von $\geq 0,1$ festgesetzt. Wurden Proben verbrauchter Hybridoma - Kulturmedien (letzter Mediumwechsel vor mehr als zwölf Stunden) im ELISA untersucht, reagierten auch Kulturmedien aus Vertiefungen ohne Zell - Kolonien mit Extinktionen von 0,3 bis 0,4. Die Medien auswachsender Kolonien wurden in siebentägigem Abstand im ELISA untersucht.

Wachstum von Hybridoma - Zellkolonien :

Zehn Tage nach der Zellfusion reagierten im ersten Screening - ELISA auf OPV - Ak 20 von 200 koloniehaltigen Vertiefungen positiv. Diese Ak - sezernierenden Kolonien wurden weitervermehrt und wiederholt getestet. Nach 35 Tagen produzierten jedoch nur noch sechs dieser Kolonien im ELISA reagierende Ak. Die Medien dieser Kolonien er -

reichten Werte von 1 : 32 bis 1 : 512.

Die Ak - Produktion der Hybridoma - Zellkolonien im Verlauf ihres Wachstums ist in Tabelle 4 dargestellt. Nach 35 Tagen wurden insgesamt weniger Kolonien getestet, da einige Hybridoma - Kolonien die Ak - Sekretion eingestellt hatten. Die Medium - Titer im ELISA stiegen von 1 : 4 bis 1 : 32 auf 1 : 32 bis 1 : 512 nach 35 Tagen. Anschließend wurden die Zellen der positiven Kolonien kloniert.

TABELLE 4 : Anzahl der Hybridoma - Zellkolonien (ELISA - Titer) mit Ak - Sekretion im Verlauf ihres Wachstums.

	ELISA - Titer (1 :)									insges.pos./ getestet
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
1. Test	20	3								20/200
2. "		3	4		1					8/18
3. "		2	4	1	6					10/18
4. "		3	2	1	1		5			12/14
5. "				2			6			8/12
6. "					1	1	1	1	2	6/8

Klonierung von Hybridoma - Zellkolonien :

35 Tage nach der Zellfusion wurden fünf Ak - sezernierende Kolonien (Kolonie 1, 2, 4, 5, 6; ELISA - Titer 1 : 64 bis 1 : 512) mit Hilfe der Limiting Dilution - Technik kloniert. Die Kolonie Nr. 3 wurde wegen schlechter Wachstumstendenzen nicht einbezogen. Die Prüfung der Zellklone im Screening - ELISA auf MAK erfolgte zehn Tage nach der Klonierung und darauffolgend in wöchentlichen Abständen. Es wurden nur die Zellkulturüberstände aus Vertiefungen mit einer einzelnen Klon - Kolonie untersucht. Von den fünf klonierten Hybridoma - Kolonien waren in insgesamt 1.440 beschickten Vertiefungen von Mikrozellkulturplatten

131 einzelne Klone ausgewachsen (9,09%) . Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die MAK - sezernierende Zahl von Klonen während der Vermehrung.

TABELLE 5 : Anzahl von MAK - sezernierenden Klonen
(ELISA - Ak) .

Ursprungs - Kolonie	Zahl der positiven Klone / insgesamt getestet				
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	5.Test
1	25/26	6/6	0/6	0/6	0/6
2	18/35	10/10	0/10	0/8	0/8
4	18/34	6/12	0/12	0/11	0/10
5	3/15	2/2	2/2	2/2	2/2
6	18/21	12/12	6/12	6/6	3/6
Summe	82/ 131	36/42	8/42	8/33	8/32

Von 131 im ersten Screening - ELISA untersuchten Klon - Kolonien wurden 82 als positiv gewertet (Extinktions - werte $\geq 0,1$ bei einer Verdünnung von 1 : 2) . Sie stammten von allen fünf klonierten Kolonien ab. Im Laufe der Weitervermehrung waren in den Medien der Klone von Stamm - kolonie 1, 2 und 4 keine Ak mehr im ELISA nachweisbar. Bei bestimmten Klonen aus den Kolonien 5 und 6 sistierte die Ak - Sekretion ebenfalls. 35 Tage nach der Klonierung konnten noch fünf Ak - sezernierende Klone im ELISA identifiziert werden, sie stammten von den Kolonien 5 und 6 ab und wurden demgemäß mit 5/1, 5/2, 6/3, 6/8 und 6/11 bezeichnet. Die ELISA - Titer in den Medien dieser Klone lagen im Bereich 1 : 32 bis $> 1 : 256$. Von den Klonen wurden serumfreie Proben der Kulturmedien gewonnen und im Vergleich mit FKS - haltigen Hybridoma - Kulturmedien im ELISA auf ihren Ak - Gehalt untersucht. Die ermittelten

ELISA - Werte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die FKS - haltigen Kulturmedien reagierten im ELISA in den Verdünnungen 1 : 32 bis 1 : 256, serumfreie Medien nur von 1 : 8 bis 1 : 256 positiv; der Klon 6/3 blieb negativ.

TABELLE 6 : Ak - Titer im ELISA (1 :) im Medium von fünf MAK sezernierenden Klonen.

Klon	5/1	5/2	6/3	6/8	6/11
Kulturmedium mit FKS	128	32	128	> 256	32
Serumfreies Kulturmedium	16	256	neg.	8	8

4.3.2 Vermehrung der MAK - sezernierenden Zellklone in Mäuseasciten

Die Hybridoma - Zellklone 5/1, 5/2, 6/3, 6/8 und 6/11 wurden in mit Pristane immunsuppressiv vorbehandelten BALB/c Mäusen intraperitoneal weitervermehrt und die Ak - haltigen Asciten gewonnen. Die Untersuchung auf Ak erfolgte entsprechend dem ELISA - Verfahren zur Untersuchung der Hybridoma - Kulturmedien (Ausgangsverdünnung 1 : 5) . Alle Mäuseasciten reagierten mit den MVA - Platten so stark, daß die Extinktionswerte in den Anfangsverdünnungen nicht meßbar waren (> 2,0) . Die ELISA - Titer lagen im Bereich von 1 : 10.240 bis über 1 : 655.360. Auf Kontroll - platten banden die Mäuseasciten ebenfalls ab 1 : 320 bis 1 : 5.120 mit Extinktionswerten $\geq$ 0,1 (vgl. Tabelle 7) . Die Ergebnisse dieser ELISA - Tests sind in den Abbildungen 1a und 1b schematisch dargestellt.

ABBILDUNG 1a: ELISA - Titer (1 :) auf der MVA - Platte von MAK in Mäuse -
asciten bei Markierung mit anti - Maus Konjugat.

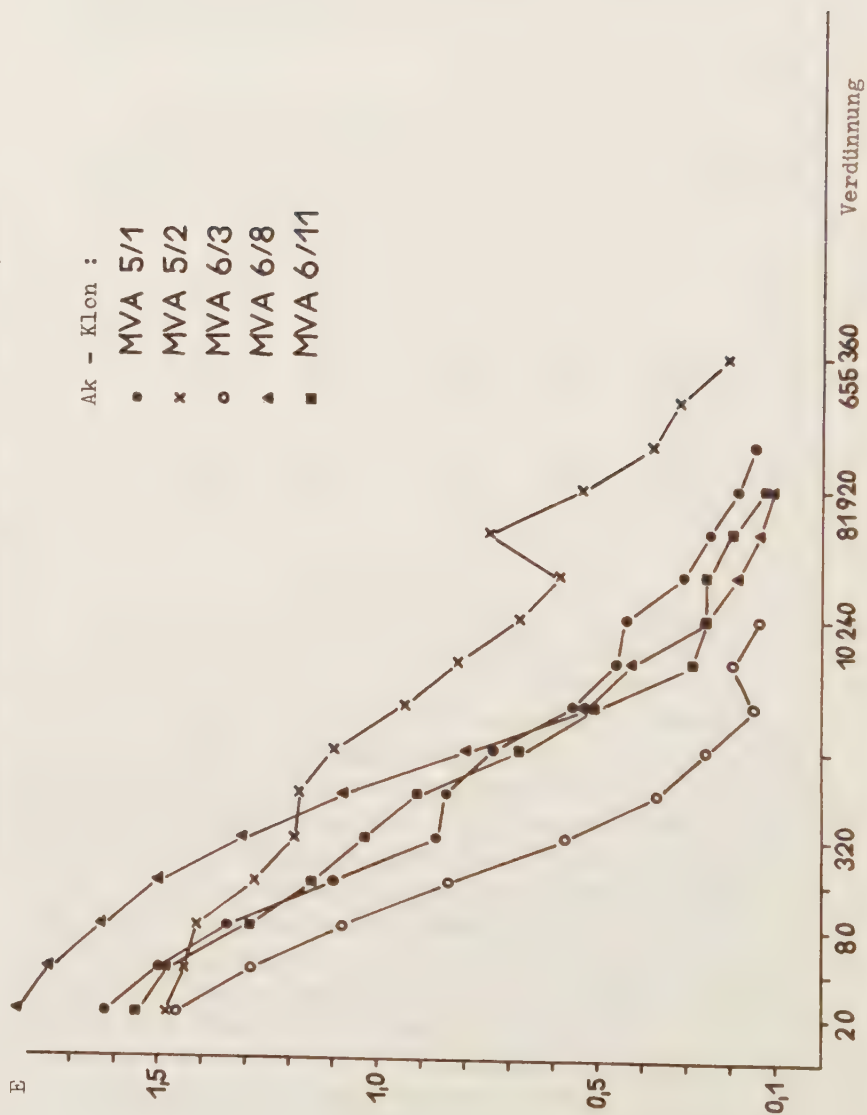


ABBILDUNG 1b : ELISA - Titer (1 :) auf der Kontrollplatte von MAK in Mäuse -
asciten bei Markierung mit anti - Maus Konjugat.

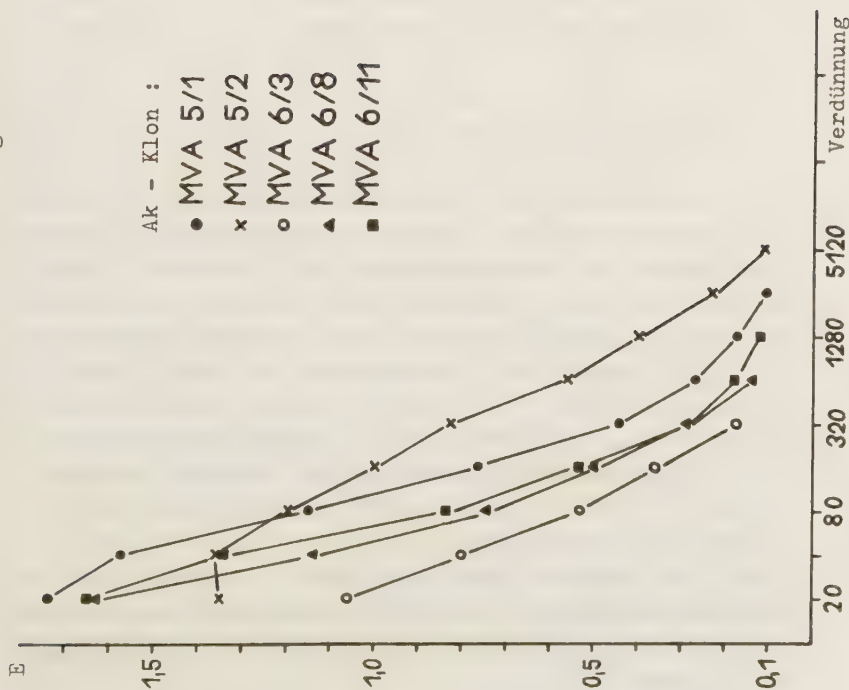


TABELLE 7 : ELISA - Titer (1 :) von fünf Mäuseasciten
auf MVA - und Kontrollplatten.

Klon	5/1	5/2	6/3	6/8	6/11
MVA - Platte	163.840	>655.360	10.240	81.920	81.920
Kontroll - platte	2.560	5.120	320	640	1.280

4.3.3 Untersuchung der MAK im Neutralisationstest

Proben von FKS - haltigen und serumfreien Kulturüberständen sowie von Ak - haltigen Mäuseasciten wurden im N - Test untersucht. In keiner Probe der fünf Klone ließen sich virusneutralisierende Ak nachweisen.

4.3.4 Bestimmung der Immunglobulin - Subklassen von MAK

MAK aus Hybridoma - Kulturmedien wurden durch Markierung mit anti - Maus Isotyp - Seren von Kaninchen im ELISA untersucht. Die Verdünnungen der anti - Isotyp - Seren wurden nach einer vorausgegangenen Schachbrett titration so gewählt, daß Ak - negative Proben mit Extinktionswerten von $< 0,02$ reagierten (Verdünnungen der anti - Isotyp - Seren vgl. Tabelle 8) . Die auf MAK zu untersuchenden Proben wurden 1 : 4 vorverdünnt. In Tabelle 8 sind die ELISA - Extinktionswerte von MAK in Hybridoma - Kultur - medien nach Markierung mit sechs verschiedenen anti - Isotyp - Seren wiedergegeben.

Positiv zu wertende Extinktionen $\geq 0,1$ ergaben die Klone 5/1, 5/2 und 6/11 mit dem anti - IgM Serum. Die Klone 6/3 und 6/8 reagierten mit keinem der anti - Isotyp - Seren signifikant.

TABELLE 8 : ELISA - Extinktionswerte von MAK in Hybridoma - Kulturmedien (1 : 4) bei der Untersuchung mit anti - Isotyp - Seren.

anti - Isotyp - Serumverdünnung (1 :)						
MAK -	IgA	IgM	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
Klon	400	200	400	1.600	400	400
5/1	0,015	0,440	0,040	0,022	0,027	0,028
5/2	0,013	0,342	0,038	0,018	0,028	0,020
6/3	0,014	0,055	0,038	0,014	0,018	0,012
6/8	0,009	0,035	0,015	0,020	0,018	0,016
6/11	0,014	0,116	0,008	0,013	0,015	0,011

MAK in Mäuseasciten wurden im ELISA mit anti - Maus - Isotyp Konjugaten untersucht (vgl. 3.6.3) . Die Asciten wurden auf der MVA - Platte 1 : 100 - 1 : 12.800 , die Konjugate 1 : 250 verdünnt eingesetzt; als positiv wurden wiederum die Extinktionswerte von $\geq 0,1$ gewertet.

Die Proben der Ascites - Klone 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 banden nur mit dem anti - IgM Konjugat bei Titern über 1 : 12.800. Nach Markierung mit anti - IgA bzw. anti - IgG Konjugat lagen die Extinktionswerte unter 0,05. Der Klon 6/3 reagierte mit keinem der anti - Isotyp Konjugate mit meßbaren Farbreaktionen. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die Mäuseasciten auch durch Markierung mit dem anti - Maus - IgM Serum von Kaninchen (1 : 200) untersucht. Die Proben der Klone 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 erreichten Titer über 1 : 6.400, der Klon 6/3 einen Titer von 1 : 200.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgern, daß die MAK der Klone 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 mit größter Wahrscheinlichkeit der IgM - Klasse zugeordnet werden dürfen. Keine Aussage über die Einordnung war unter den verwendeten Unter -

suchungsmethoden für die MAK des Klons 6/3 möglich.

4.4 Reinigung der MAK aus Mäuseasciten

4.4.1 Affinitätschromatographie mit Protein A - Sepharose

Die MAK in Mäuseasciten wurden zuerst über ein Prot A - Affinitätschromatographieverfahren gereinigt. Prot A bindet nur Immunglobuline mit freien Fc - Stücken (IgG - Sub - klassen) , nicht aber IgM, IgA und IgE.

Je 1 ml Mäuseascites wurde auf eine Prot A - Säule aufgetragen, die nicht gebundenen Ascitesbestandteile (als " Durchlauf " bezeichnet) getrennt von den Eluat en gesammelt und alle Proben im ELISA auf ihren Ak - Gehalt untersucht. Die Elution der Säule ergab von 1 ml Ascites ca. 20 ml Durchlauf und 15 ml Eluat. Dies entspricht für die Prüfung im ELISA einer Vorverdünnung der Proben von 1 : 20 bzw. 1 : 15 . Die Prot A - Fraktionen wurden auf MVA - Platten und Kontrollplatten ausgewertet (Anfangs - verdünnung 1 : 2) und mit anti - Maus Konjugat markiert. Als positive Kontrolle diente Mäusehyperimmunserum. Die Extinktionswerte bei einer Verdünnung 1 : 2 und die ELISA - Titer der Prot A - gereinigten Klone 5/1 und 6/8 mit MVA - und Kontrollplatten sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Eluate der Asciten reagierten im ELISA auf Kontroll - platten mit höherer Extinktion als auf MVA - Platten ; dies galt auch für die Titer. Die Prot A - Durchläufe dagegen banden nur auf MVA - Platten überzeugend positiv.

Wenn man die Reaktionen mit Kontrollplatten als unspezifisch annimmt, enthielten die Prot A - Eluate vorwiegend nichtspezifisch an die Platten bindende Globuline (das Bindungsverhalten der Ak an Antigen - Kontrollplatten war praktisch identisch) . Ein unterschiedliches Bindungsverhalten zeigten die Prot A - Durchläufe. Die Titer von Antigen - und Kontrollplatten differierten markant. In den

Abbildungen 2a und 2b sind die Extinktionswerte des Prot A - gereinigten Klon 5/1 auf MVA - und Kontrollplatten vergleichend dargestellt.

TABELLE 9 : Extinktionswerte und Titer (1 :) im ELISA der Prot A - gereinigten MAK - Klone 5/1 und 6/8 in Mäuseasciten.

		Prot A - Eluat		Prot A - Durchlauf	
MAK - Klon		ELISA - Platte		ELISA - Platte	
		MVA	Kontrolle	MVA	Kontrolle
5/1	Extinktion	1,679	1,758	1,566	0,343
	ELISA-Titer	512	2.048	256	4
6/8	Extinktion	1,744	1,730	1,127	0,308
	ELISA-Titer	512	2.048	256	8

Die Prot A - Fraktionen (Anfangsverdünnung 1 : 2) wurden parallel auch mit anti - Isotyp Konjugaten (1 : 250) markiert. Die Eluate der Asciten 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 reagierten mit den anti - IgA, - IgG und - IgM Konjugaten negativ (Extinktionswerte < 0,1) . Die Durchläufe dieser Asciten ergaben mit dem anti - IgM Konjugat bis zu den Verdünnungsstufen > 1 : 128 Extinktionen von 2 0,1. Von Klon 6/3 ließ sich weder mit Prot A - Eluat noch mit Durchlauf eine meßbare Reaktion mit einem der anti - Isotyp Konjugate erfassen.

Die Ergebnisse der Prot A - Fraktionierung ließen vermuten, daß antigenspezifisch reagierende Ak als IgM im Durchlauf vorlagen.

ABBILDUNG 2a : Extinktionswerte (ELISA) des Prot A -
Eluates von Ascites - Klon 5/1.

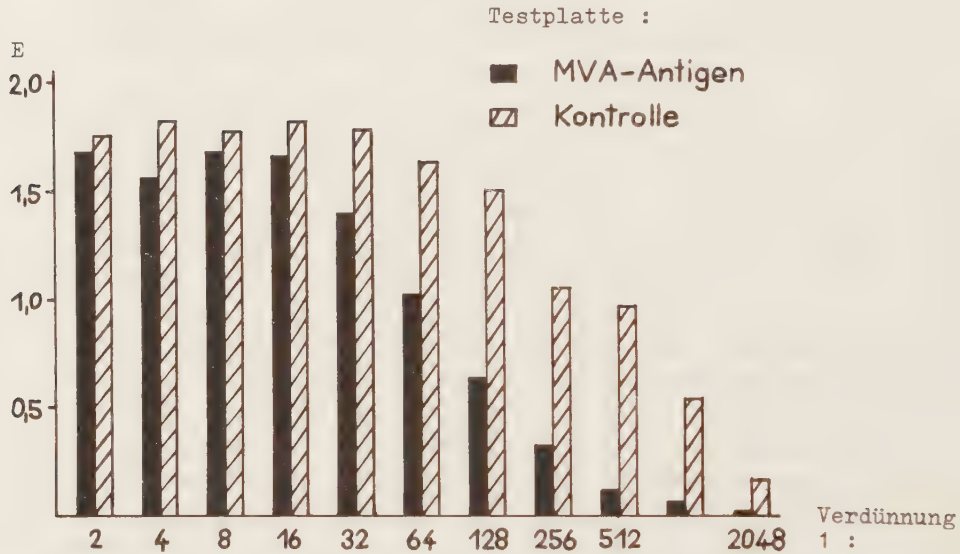
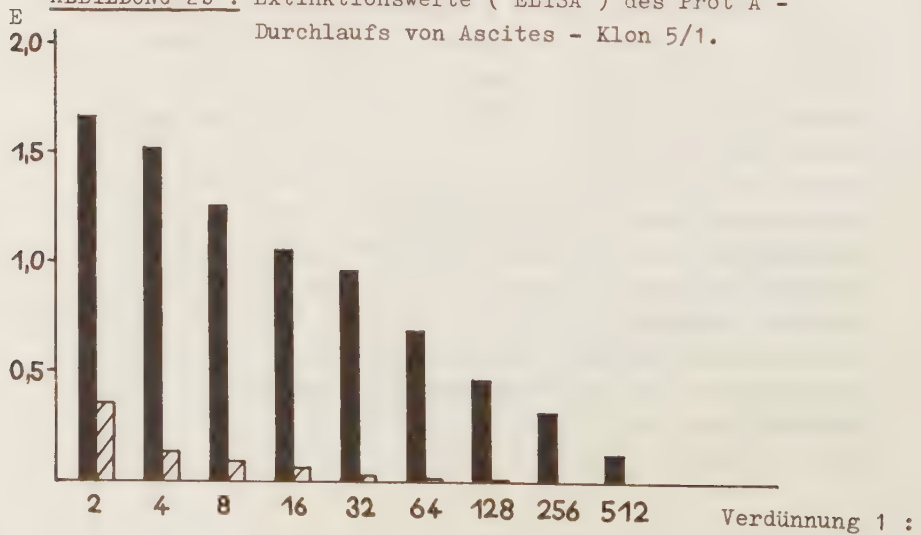


ABBILDUNG 2b : Extinktionswerte (ELISA) des Prot A -
Durchlaufs von Ascites - Klon 5/1.



4.4.2 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A - Sepharose

Die Mäuseasciten wurden mittels Con A - Affinitätschromatographie gereinigt. IgM mit einem Zuckeranteil von 12 - 15% werden dabei von Con A gebunden, nicht dagegen die Ig - Klassen IgG, IgA und IgE.

In der Fraktionierung resultierten aus 1 ml Ascites etwa 25 ml Durchlauf und 20 ml Eluat. Die beiden Fraktionen wurden wiederum getrennt gesammelt und im ELISA geprüft. Die Con A - Eluate der Mäuseasciten 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 reagierten mit den MVA - Platten unter hohen Extinktions - werten (Titer $> 1 : 128$), mit den Kontrollplatten deutlich weniger intensiv (Titer $1 : 4$ bis $1 : 16$). Die Con A - Durchläufe banden auf Antigen - und Kontroll - platten mit gegenteiliger Intensität (Antigen $1 : 16$ bis $1 : 32$ und Kontrolle $> 1 : 128$). Die Extinktionswerte der Con A - Fraktionen des Klons 5/2 mit Antigen - und Kontrollplatte sind in Tabelle 10 aufgeführt (siehe auch Abbildungen 3a und 3b) .

TABELLE 10 : Extinktionswerte (ELISA) der Con A - Fraktionen von Klon 5/2 bei Markierung mit anti - Maus Konjugat auf MVA - und Kontrollplatten.

Verdünnung	Con A - Eluat		Con A - Durchlauf	
	ELISA - Platte MVA	Kontrolle	ELISA - Platte MVA	Kontrolle
1 : 2	1,395	0,812	0,734	1,728
1 : 4	1,409	0,379	0,714	1,693
1 : 8	1,096	0,179	0,428	1,474
1 : 16	0,846	0,112	0,291	1,159
1 : 32	0,550	0,059	0,138	0,691
1 : 64	0,309	0,028	0,067	0,359
1 : 128	0,143	0,000	0,038	0,184
1 : 256	0,053	0,000	0,017	0,056

ABBILDUNG 3a : Extinktionswerte (ELISA) des Con A -
Eluates von Ascites - Klon 5/2.

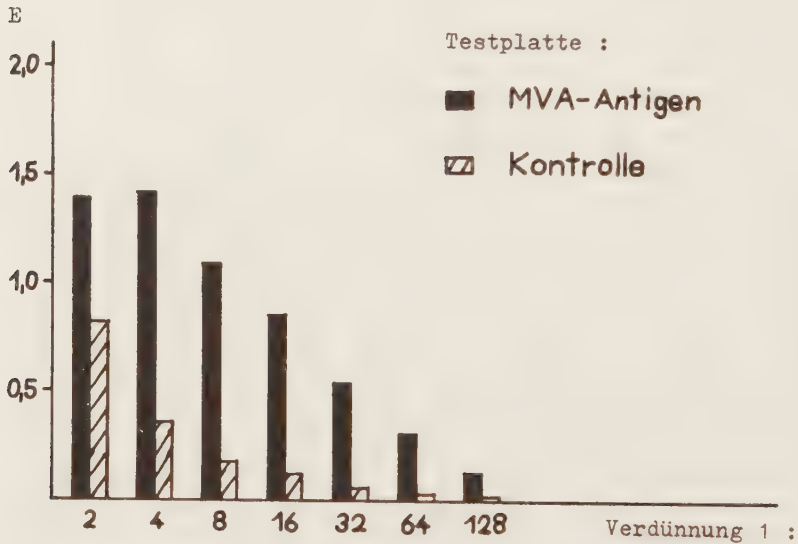
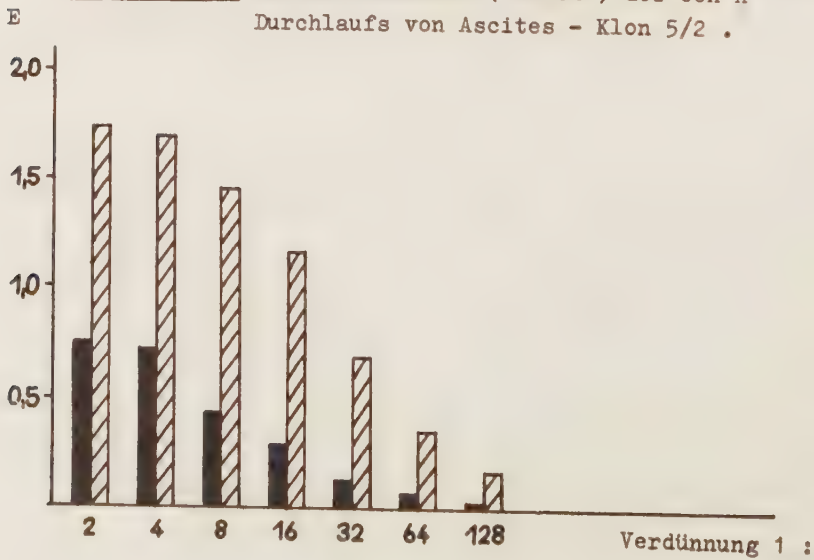


ABBILDUNG 3b : Extinktionswerte (ELISA) des Con A -
Durchlaufs von Ascites - Klon 5/2 .



Antigenspezifisch reagierende Ascitesbestandteile enthielt nach der Reinigung vor allem das Con A - Eluat. Die Proteine im Durchlauf dagegen wiesen eine Affinität zum Kunststoff der ELISA - Platten auf. Da Con A zuckerhaltige Serumbestandteile wie IgM und geringfügig auch IgG bindet, ließ das Ergebnis den Schluß zu, daß die gegen das MVA - Antigen gerichteten MAK der IgM - Klasse angehörten.

Nach der Con A - Reinigung wurden die MAK mit dem anti - IgM Konjugat bzw. dem anti - Maus Isotypen - Serum (anti - IgM) im ELISA geprüft. Die Ergebnisse aus diesem ELISA galt es mit denen aus dem ELISA nach Markierung durch anti - Maus Konjugat zu vergleichen. Die erzielten Befunde ließen sich anhand der Ergebnisse am Con A - gereinigten Klon 5/1 erläutern :

Die höchsten Extinktionswerte wurden bei Markierung des Eluates mit dem anti - Maus Konjugat gemessen (ELISA - Titer 1 : 256, Kontrolle 1 : 16), deutlich niedrigere Werte dagegen bei Inkubation mit anti - IgM Konjugat (Titer 1 : 128, Kontrolle negativ) . Mit dem anti - Maus IgM - Serum resultierten hohe Extinktionswerte sowohl mit Antigen - als auch mit Kontrollplatten (Titer > 1 : 256 bzw. 1 : 32) . Der Con A - Durchlauf reagierte nur mit dem anti - Maus Konjugat unter meßbaren Farbreaktionen. Dabei erreichte die Extinktion auf Kontrollplatten (1 : 128) mehr als die doppelte Höhe im Vergleich mit Antigenplatten (1 : 8) . Die ELISA - Titer und die Extinktionswerte (Verdünnung 1 : 2) des Con A gereinigten Klon 5/1 (Ascites) bei Untersuchung mit anti - Maus bzw. anti - IgM Konjugat sowie mit anti - Maus IgM - Serum sind in der Tabelle 11 zusammengestellt (siehe auch graphische Darstellung in den Abbildungen 4a und 4b) .

Nach der Reinigung der MAK in Mäuseasciten über Con A - Säulen waren IgM - Ak nur in den Eluaten nachweisbar, nicht in den Säulendurchläufen. Der Einsatz von anti - IgM

Konjugat statt anti - Maus Konjugat konnte dazu beitragen, falsch positive ELISA - Reaktionen auszuschließen, da die Con A - Eluate mit den Kontrollplatten nicht reagierten.

TABELLE 11 : Extinktionswerte und Titer (1 :) im ELISA des Con A - gereinigten Ascites - Klons 5/1 bei Markierung mit anti - Maus bzw. anti - IgM Konjugat sowie mit anti - Maus IgM - Serum.

Markierung (Konjugat)	Extinktionswerte und Titer (in Klammern)	
	MVA	Kontrolle
anti - Maus	1,242 (256)	0,522 (16)
anti - IgM	0,896 (128)	0,000 (neg)
anti - Maus IgM - Serum	1,171 (256)	0,349 (32)

4.4.3 Kombinierte Affinitätschromatographie mit Protein A - / Concanavalin A - Sepharose

Durch Kombination der Prot A - mit der Con A - Säule wurde geprüft, ob sich der Reinigungseffekt an Mäuseasciten über eine Chromatographie dieser Anordnung steigern läßt.

1 ml Ascites wurde auf die Prot A - Säule aufgetragen und anschließend die nicht gebundenen Bestandteile über Nacht mit NaCl - PP (pH 7,5) bei langsamster Pumpengeschwindigkeit auf die nachgekoppelte Con A - Säule gespült. Die Elution der Säulen erfolgte getrennt mit dem entsprechenden Elutionspuffer nach Abklemmen jeweils einer Säule. Der

ABBILDUNG 4a : Extinktionswerte (ELISA) des Con A - Eluates von Ascites - Klon 5/1 bei Markierung mit anti - Maus bzw. anti - IgM Konjugat sowie mit anti - Maus - IgM Serum.

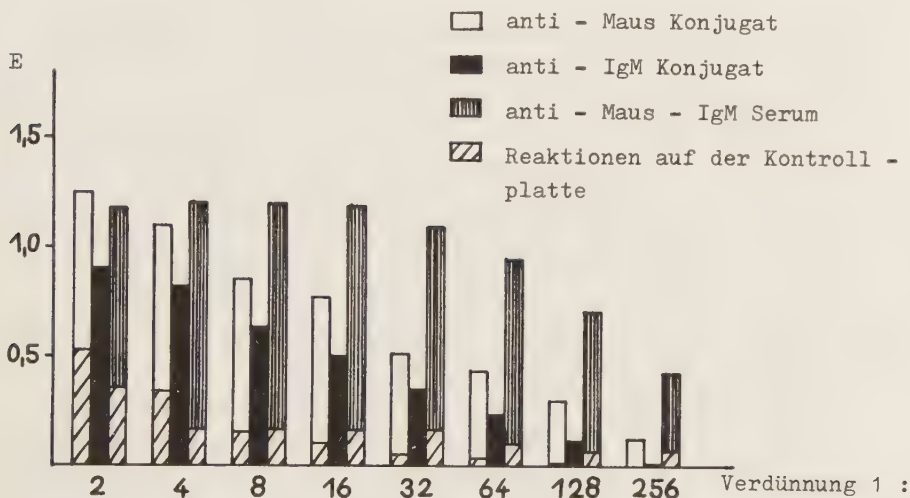
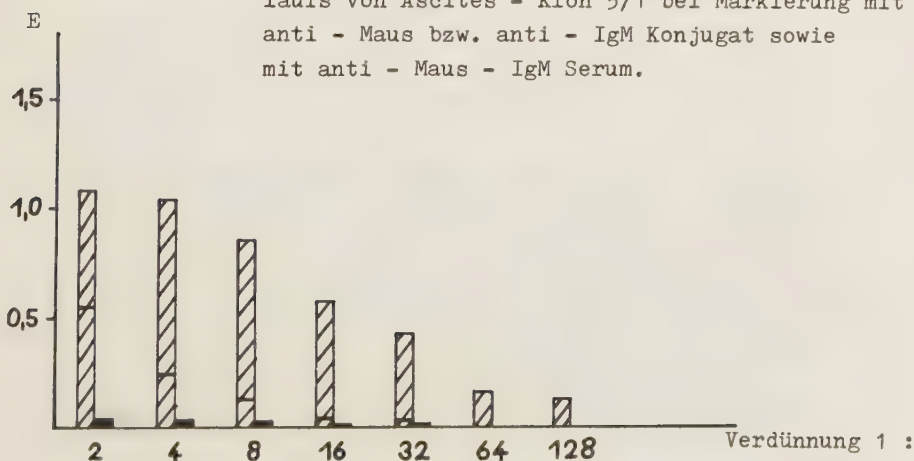


ABBILDUNG 4b : Extinktionswerte (ELISA) des Con A - Durch - laufs von Ascites - Klon 5/1 bei Markierung mit anti - Maus bzw. anti - IgM Konjugat sowie mit anti - Maus - IgM Serum.



Durchlauf (beider Säulen) sowie die Eluate von Prot A - bzw. Con A - Säule wurden getrennt gesammelt und im ELISA untersucht. Der Verdünnungseffekt bei der Reinigung von 1 ml Ascites betrug etwa 1 : 30 für den Durchlauf und 1 : 25 für die beiden Eluate.

Der Reinigungseffekt dieses System wurde anhand der ELISA - Reaktionen des Prot A - / Con A - gereinigten Ascites - Klons 5/2 aufgezeigt. Die drei nach der Reinigung erhaltenen Fraktionen wurden im ELISA zuerst mit dem anti - Maus Konjugat markiert :

Auf MVA - Platten reagierte das Con A - Eluat mit Extinktionswerten, die über dem Meßbereich des Photometers lagen (bis zur Verdünnungsstufe 1 : 32 Extinktionen > 2,00) . Der ELISA - Titer stieg auf > 1 : 256. Die Extinktion auf Kontrollplatten war nur halb so intensiv bei einem Titer von 1 : 256. Das Prot A - Eluat band auf Kontrollplatten deutlicher als auf MVA - Platten. Die im Durchlauf beider Säulen enthaltenen Proteine reagierten ähnlich (siehe Tabelle 12 und die Abbildungen 5a und 5b) .

TABELLE 12 : Extinktionswerte im ELISA (Verdünnung 1 : 2)
des Prot A - / Con A - gereinigten Ascites -
Klons 5/2 nach Markierung mit anti - IgM
Konjugat.

Fraktionen	anti - Maus Konjugat		anti - IgM Konjugat	
	ELISA - Platte		ELISA - Platte	
	MVA	Kontrolle	MVA	Kontrolle
Con A - Eluat	2,000	1,518	1,415	0,566
Prot A - Eluat	1,465	1,992	0,468	0,106
Durchlauf	1,884	1,572	1,242	0,415

Nach der Markierung der Fraktionen mit anti - IgM Konjugat waren IgM - Ak im Con A - Eluat, im Prot A - Eluat sowie im Durchlauf beider Säulen nachweisbar. Die ELISA - Titer des Klons 5/2 und die Extinktionswerte nach Reinigung mit dem kombinierten Prot A - / Con A - Verfahren sind in Tabelle 12 wiedergegeben (siehe auch Abbildungen 5 und 6) .

Eine vollständige Trennung von im ELISA antigenspezifisch und unspezifisch reagierenden Ascitesbestandteilen ließ sich auch durch die Säulenkombination nicht erzielen. Somit waren falsch positive Ergebnisse auch mit diesem Reinigungsverfahren nicht auszuschließen.

4.4.4 Identifizierung der Immunglobuline über SDS - PAGE

An den MAK - haltigen Mäuseasciten, die über die kombinierte Prot A - / Con A - Affinitätschromatographie gereinigt bzw. fraktioniert worden waren, wurde der Reinigungseffekt und die Verteilung der Ascitesproteine auf die Fraktionen in der SDS - PAGE untersucht. Die Banden der aufgetrennten Proteine wurden nach Silberfärbung anhand ihrer Molekulargewichte im Vergleich mit MG - Standards identifiziert.

Der Durchlauf beider Säulen enthielt Proteine mit folgenden MG : 20 - 30 KD; 55 - 56 KD und 57 - 60 KD; 66 KD (sehr breite und prominente Bande) ; fünf Proteine mit 70 - 130 KD.

Im Con A - Eluat ließen sich folgende Proteine trennen : 55 - 60 KD; 70 KD; zwei Proteine mit 120 - 140 KD; eine sehr breite Bande am obersten Rand des Gels (>> 220 KD) . Im Prot A - Eluat war in Spuren ein 66 KD - Protein sowie ein Protein mit > 200 KD nachweisbar.

Zur Auswertung der SDS - PAGE Proteinmuster Prot A - / Con A - gereinigter MAK wurden die Molekulargewichte humaner Immunglobuline herangezogen (Lit. bei JOHNSTONE

ABBILDUNG 5a : Extinktionswerte (ELISA) der Fraktionen des Prot A - / Con A - gereinigten Ascites - Klon 5/2 bei Markierung mit anti - Maus Konjugat (MVA - Platte) .

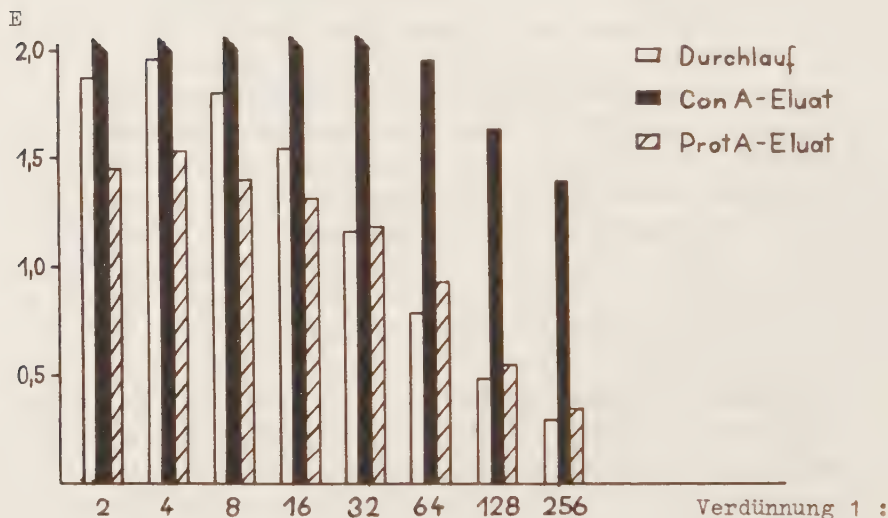


ABBILDUNG 5b : Extinktionswerte (ELISA) der Fraktionen des Prot A - / Con A - gereinigten Ascites - Klon 5/2 bei Markierung mit anti - Maus Konjugat (Kontrollplatte) .

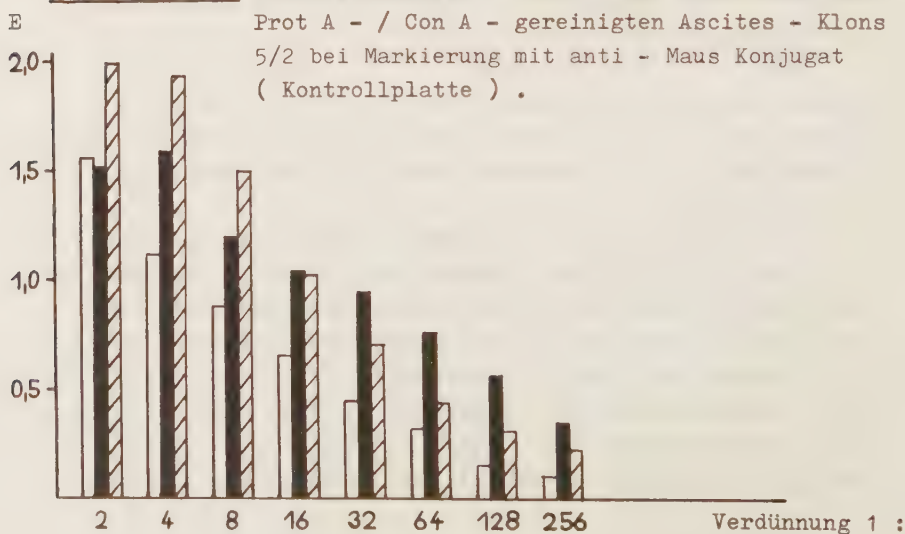


ABBILDUNG 6a : Extinktionswerte (ELISA) der Fraktionen des Prot A - / Con A - gereinigten Ascites - Klon 5/2 bei Markierung mit anti - IgM Konjugat (MVA - Platte) .

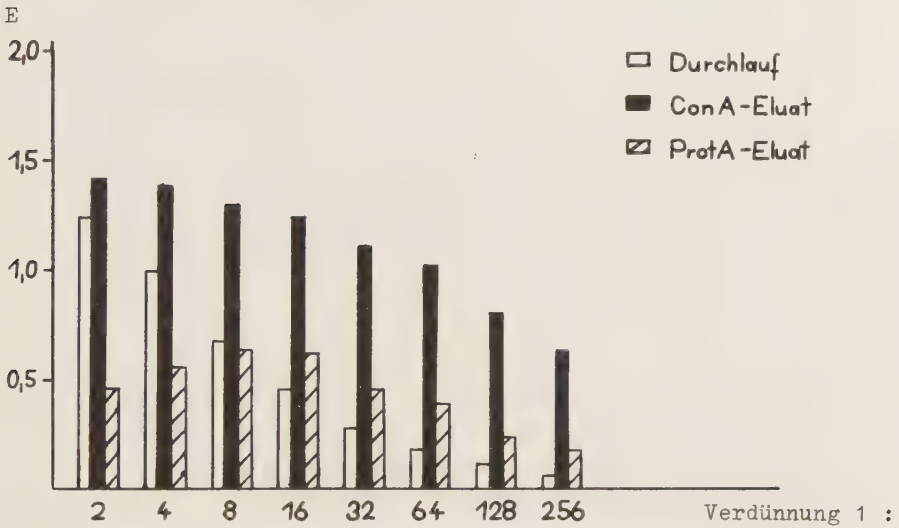
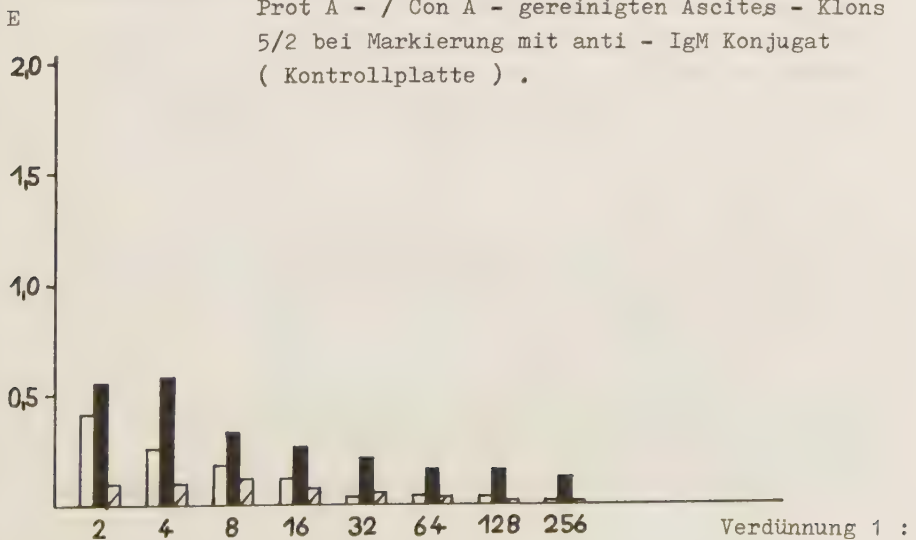


ABBILDUNG 6b : Extinktionswerte (ELISA) der Fraktionen des Prot A - / Con A - gereinigten Ascites - Klon 5/2 bei Markierung mit anti - IgM Konjugat (Kontrollplatte) .



und THORPE, 1982) .

Der Hauptanteil an Serumalbuminen mit einem MG von 66 KD war im Durchlauf zu finden; zum Vergleich diente im MG - Standard BSA mit 66 KD. Andere Proteinbanden wurden als Immunglobuline oder deren Untereinheiten wie folgt interpretiert : Proteine mit MG von 20 - 30 KD dürften solitäre L - Ketten von Immunglobulinen (alle Ig - Klassen) mit einem MG von 23 KD darstellen. Da diese weder von Prot A (Prot A erkennt das freie Fc - Stück von schweren H - Ketten am C - terminalen Ende des Moleküls) noch von Con A gebunden werden, erschienen sie im Durchlauf. Proteine in den MG - Bereichen 55 - 60 KD können einzelne H - Ketten von Immunglobulinen sein; die γ - Kette von IgG₁ und IgG₂ besitzt ein MG von 49 KD, die von IgG₃ 57 KD und die μ - Kette von IgM 57 KD. Teilweise dissoziierte Immunglobuline (durch Kochen in Probenpuffer) haben MG im Bereich von 72 - 80 KD (L - und γ - Kette von IgG₁ und IgG₂ = 49 KD + 23 KD bzw. bei IgG₃ und IgM = 57 + 23 KD) . Proteine mit MG im Bereich 55 - 60 KD und 70 - 80 KD wurden im Durchlauf und im Con A - Eluat nachgewiesen.

Intakte Immunglobuline besitzen MG von 146 KD (IgG₁ und IgG₂) , 160 KD (Monomer von IgM) und 170 KD (IgG₃) . Alle drei Fraktionen enthielten diesen MG entsprechende Banden. Nur das Con A - Eluat wies eine Proteinbande auf, die intakten IgM - Pentameren (900 KD) entspricht.

4.5 Spezifität der ELISA - Reaktion zwischen MAK gegen den VV - Stamm MVA und Orthopockenviren

4.5.1 Auswahl der Konjugate

Die MAK in ungereinigten Mäuseasciten ergaben im ELISA bei Markierung mit anti - Maus Konjugat in niedrigen Verdünnungen (1 : 5 bis 1 : 320) mit der MVA - und mit

Kontrollplatten fast identische Extinktionswerte (vgl. auch Abbildungen 1a und 1b) . In höheren Verdünnungen ($> 1 : 640$) dominierten die MVA - spezifischen Bindungen. Bei Verwendung von anti - IgM Konjugat dagegen traten auch in niedrigen Verdünnungsstufen der MAK deutliche Unterschiede in der Extinktion zwischen Antigen - und Kontrollplatten auf. Die Werte lagen allerdings absolut um die Hälfte niedriger.

Die ELISA - Titer von MAK in ungereinigten Mäuseasciten auf MVA - und Kontrollplatten bei Untersuchung mit anti - IgM Konjugat sind in den Abbildungen 7a und 7b, die bei Markierung mit anti - Maus Konjugat in den Abbildungen 1a und 1b graphisch dargestellt (vgl. dazu auch Tabellen 13 und 14) .

TABELLE 13 : Extinktionswerte der MAK in ungereinigten Mäuseasciten (Verdünnung $1 : 20$) im ELISA bei Markierung mit anti - Maus bzw. anti - IgM Konjugat auf MVA - und Kontrollplatten.

MAK - Klon	anti - Maus Konjugat		anti - IgM Konjugat	
	ELISA - Platte MVA	Kontrolle	ELISA - Platte MVA	Kontrolle
5/1	1,614	1,734	0,840	0,505
5/2	1,475	1,351	0,953	0,584
6/3	1,454	1,059	0,000	0,000
6/8	1,846	1,627	0,766	0,214
6/11	1,546	1,634	0,724	0,367
Kontroll- serum	1,720	0,135	0,590	0,803
($1 : 200$)				

ABBILDUNG 7a: ELISA - Titer (1 :) auf der MVA - Platte von MAK in Mäuseasciten bei Markierung mit anti - IgM Konjugat.

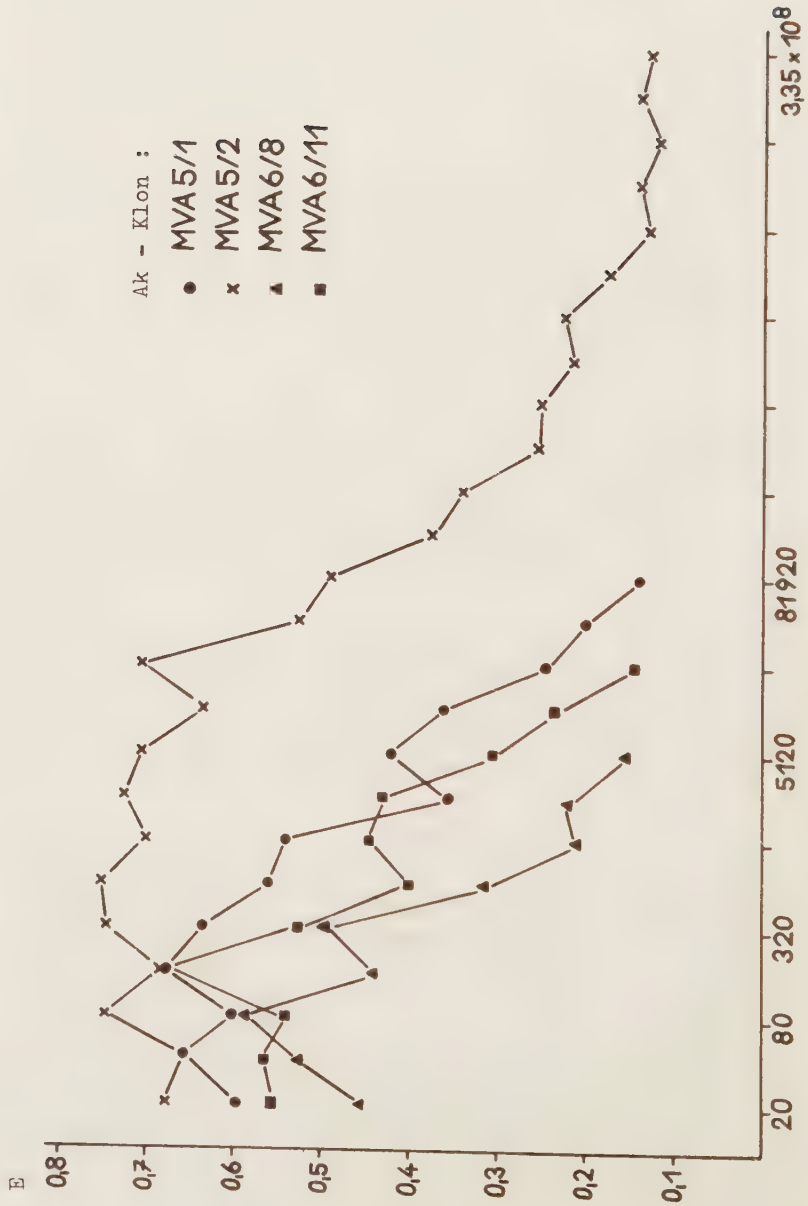


ABBILDUNG 7b: ELISA - Titer (1 :) auf der Kontrollplatte von MAK in Mäuseasciten
bei Markierung mit anti - IgM Konjugat.

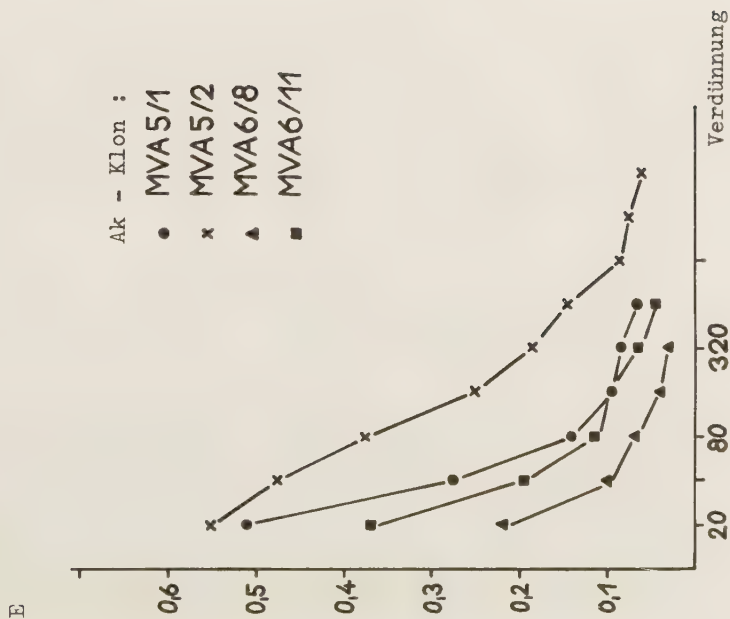


TABELLE 14 : Titer (1 :) der MAK in ungereinigten Mäuseasciten im ELISA bei Markierung mit anti - Maus bzw. anti - IgM Konjugat.

MAK - Klon	anti - Maus Konjugat		anti - IgM Konjugat	
	ELISA - Platte MVA	Kontrolle	ELISA - Platte MVA	Kontrolle
5/1	163.840	2.560	81.920	80
5/2	655.360	5.120	$3,35 \times 10^8$	640
6/3	10.240	320	neg	neg
6/8	81.920	640	5.120	40
6/11	81.920	1.280	20.480	80
Kontroll- serum	409.600	800	400	200

Durch die Markierung der MAK - Bindungen mit anti - IgM Konjugat ließen sich die positiven Reaktionen auf Kontrollplatten weitgehend reduzieren. Die nachfolgenden Kreuzteste wurden deshalb mit diesem anti - Isotyp Konjugat durchgeführt. Der Klon 6/3 wurde in die folgenden Untersuchungen nicht mehr einbezogen.

4.5.2 Reaktionen von MAK in Mäuseasciten mit verschiedenen Orthopockenviren im ELISA

Die Mäuseasciten von MAK - Klon 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 wurden vergleichend auf Ag - Ak - Kreuzreaktionen mit heterologen VV - und OPV - Antigenen im ELISA geprüft. Dazu wurden Testplatten mit verschiedenen VV - Stämmen (Elstree, IHD, VR 325 und Levaditi) , den OPV - Stämmen von KPV, BPV, EPV und KRV sowie dem Parapoxvirus capri (Orf - Virus) beschichtet und vorbereitet.

Die im ELISA erzielten Titer der Ascites - Klone gegen die verschiedenen OPV - Antigene sind in der Tabelle 15 wiedergegeben. Die für den VV - Stamm MVA spezifischen MAK reagierten im ELISA mit allen OPV und dem Parapocken - virus. Die MAK von Klon 5/2 mit dem höchsten Ak - Titer gegen MVA wiesen auch gegen alle anderen einbezogenen Pockenviren die höchsten Ak - Titer auf. In abnehmender Reihenfolge banden die MAK der Klone 5/1, 6/8 und 6/11 ebenfalls gegen alle Antigene. Die ELISA - Titer der Klone gegen die verschiedenen Antigene sind in den Abbildungen 8 bis 11 schematisch dargestellt.

TABELLE 15 : Titer (1 :) im ELISA der MAK in unge -
reinigten Mäuseasciten gegen OPV und Orf -
Virus.

Antigen	MAK - Klon			
	5/1	5/2	6/8	6/11
VV - MVA	81.920	$3,35 \times 10^8$	5.120	20.480
- Elstree	40.960	512.000	2.560	2.560
- IHD	640	64.000	2.560	1.280
- VR 325	10.240	1.024.000	2.560	2.560
- Levaditi	163.840	1.024.000	20.480	10.240
KPV	163.840	4.096.000	40.960	10.240
BPV	40.960	512.000	1.280	5.120
EPV	40.960	2.048.000	327.680	81.920
KRV	20.480	32.000	1.280	5.120
Orf - Virus	81.920	512.000	1.280	5.120

Die Extinktionswerte der MAK (bei konstanten Verdünnungen) gegen die Antigene sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Anhand der Extinktionswerte der vier MVA - Ak - Klone gegen die untersuchten Antigene ließen sich drei " Verwandtschaftsgruppen " ordnen, die sich jedoch nur auf die ELISA - Reaktionen und nur auf diese MAK beziehen sollten :

- (1) VV - MVA und Levaditi, KPV und EPV;
- (2) VV - Elstree und - VR 325; sie verhielten sich ähnlich, aber mit deutlich geringerer Bindungsintensität;
- (3) VV - IHD, BPV, KRV und Orf - Virus; sie bildeten die Gruppe mit den niedrigsten Extinktionen, wobei VV - IHD und KRV die niedrigsten Titer aufwiesen.

TABELLE 16 : Extinktionswerte (ELISA) von MAK in Mäuse - asciten gegen OPV und Orf - Virus.

MAK - Klon (Verdünnung 1 :)				
Antigen	5/1	5/2	6/8	6/11
	160	1.000	160	160
VV - MVA	0,675	0,751	0,436	0,678
- Elstree	0,562	0,635	0,457	0,410
- IHD	0,279	0,443	0,441	0,155
- VR 325	0,545	0,640	0,695	0,341
- Levaditi	0,803	0,697	0,601	0,501
KPV	0,751	0,794	0,714	0,690
BPV	0,496	0,446	0,396	0,362
EPV	0,789	0,818	0,744	0,742
KRV	0,473	0,355	0,374	0,288
Orf - Virus	0,524	0,427	0,194	0,459
Kontrolle	0,099	0,085	0,037	0,089

ABBILDUNG 8a : Titer im ELISA (1 :) von MAK 5/2 (Ascites) gegen
verschiedene VW - Stämme.

E

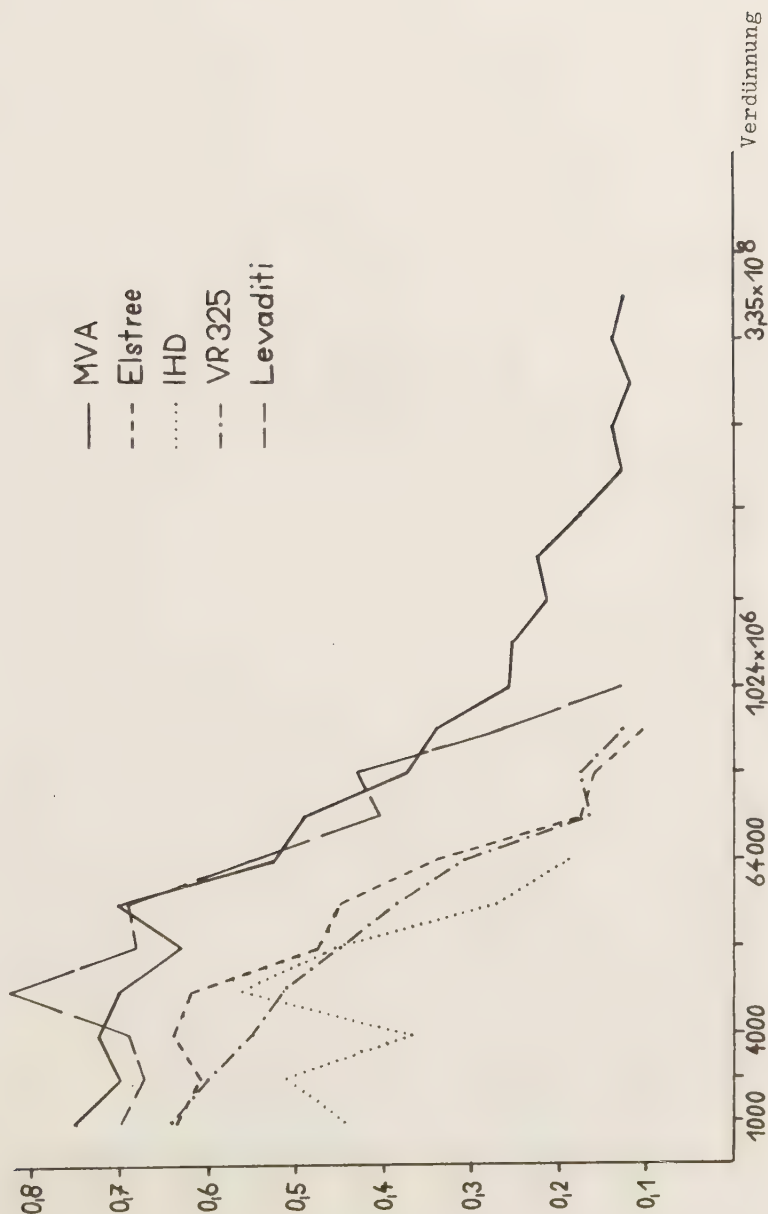


ABBILDUNG 8b: Titer im ELISA (1 :) von MAK 5/2 (Ascites) gegen
VV - MVA, KPV, EPV, KRV, BPV und Orf - Virus.

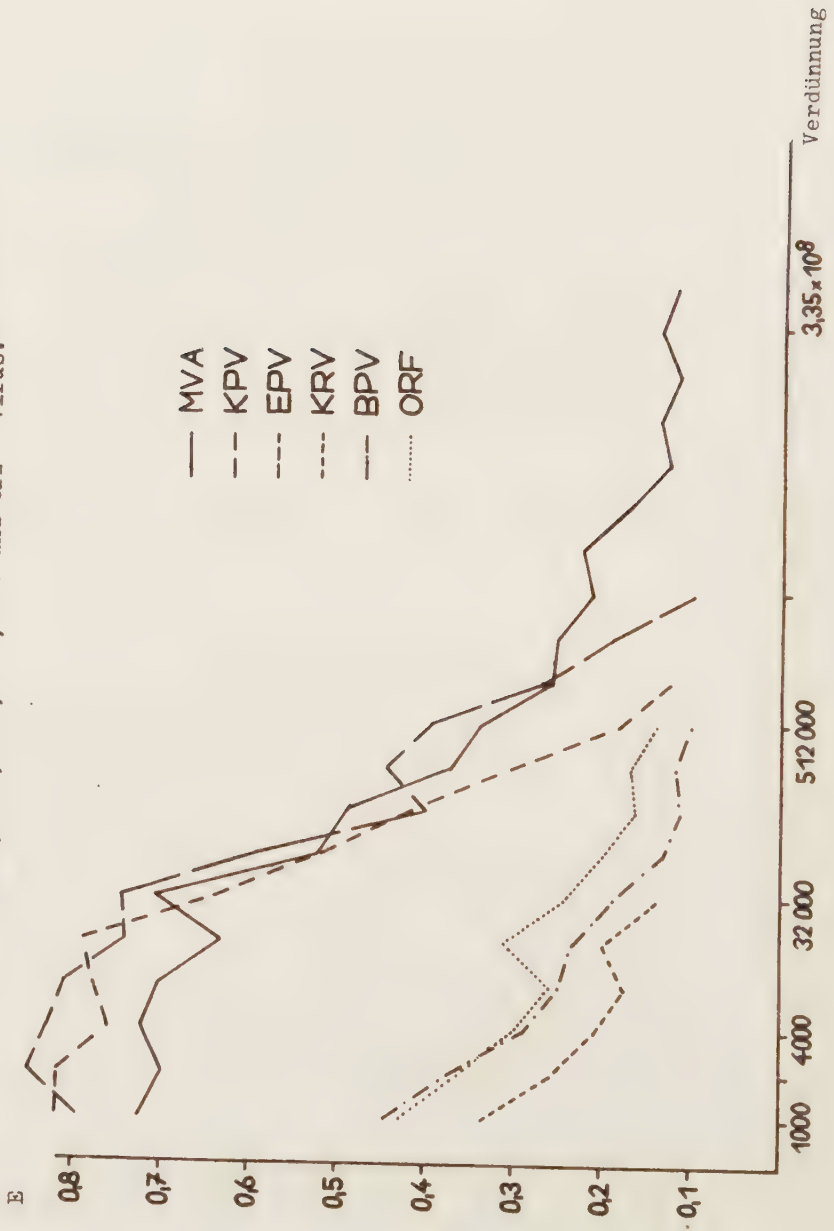


ABBILDUNG 9a: Titer im ELISA (1 :) von MAK 5/1 (Ascites) gegen
verschiedene VV - Stämme

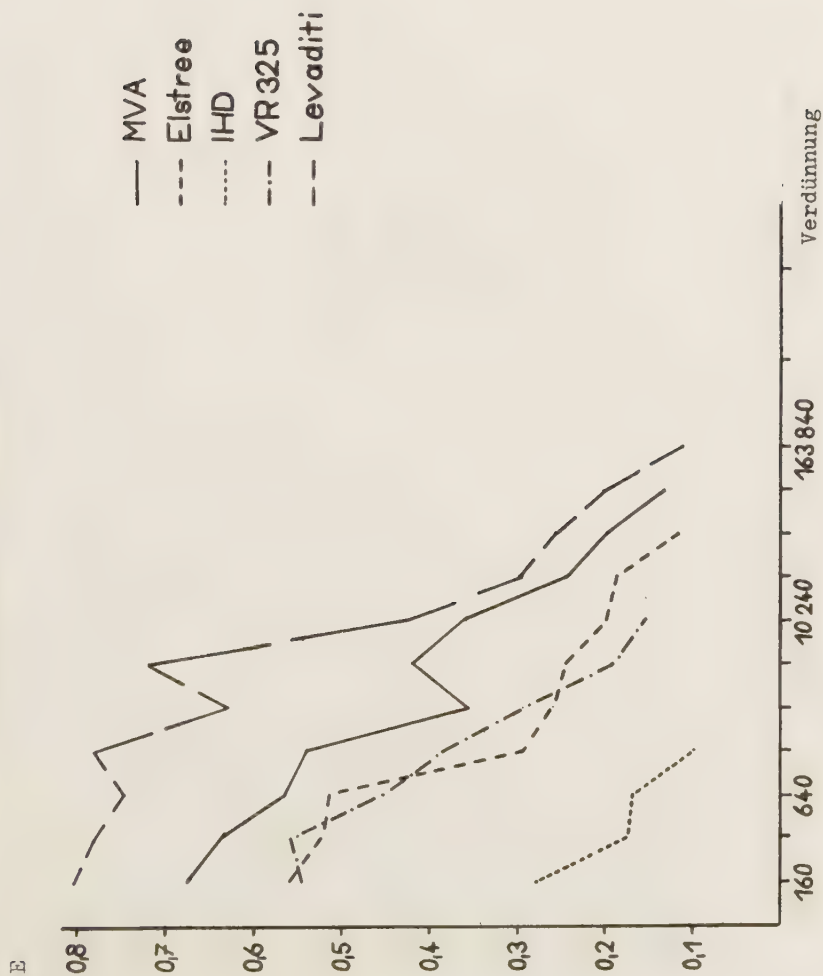


ABBILDUNG 10a: Titer im ELISA (1 :) von MAK 6/8 (Ascites) gegen verschiedene VV - Stämme.

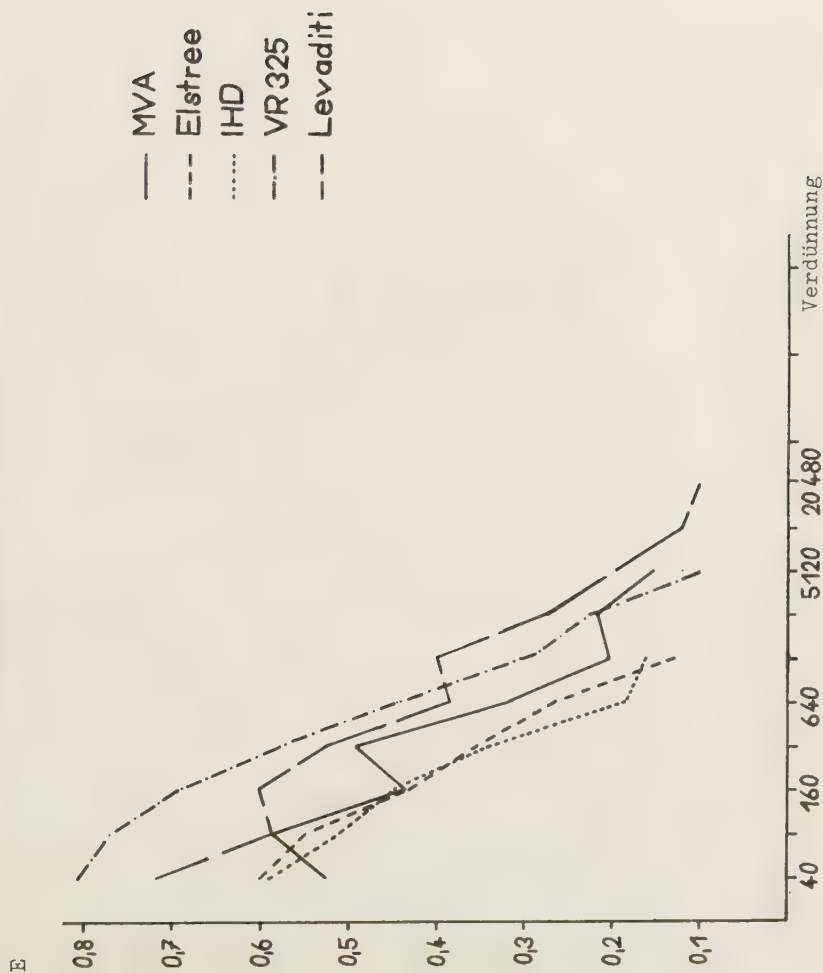


ABBILDUNG 10b: Titer im ELISA (1 :) von MAK 6/8 (Ascites) gegen
VV - MVA, KPv, EPV, KRV, BPV und Orf - Virus.

E

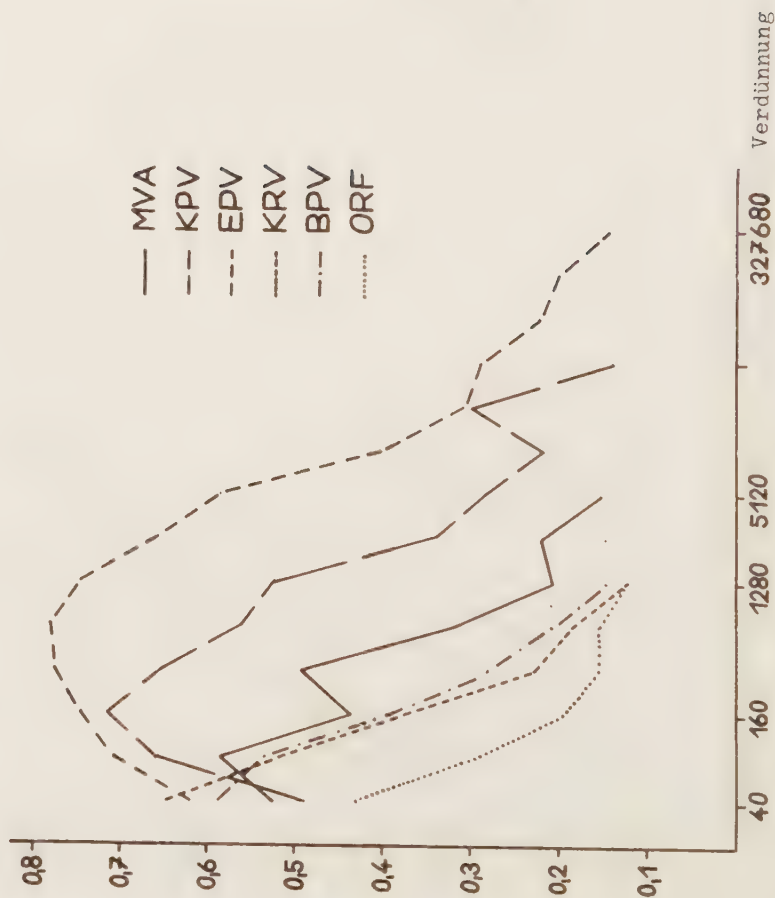


ABBILDUNG 11a: Titer im ELISA (1 :) von MAK 6/11 (Ascites) gegen verschiedene VV - Stämme.

E

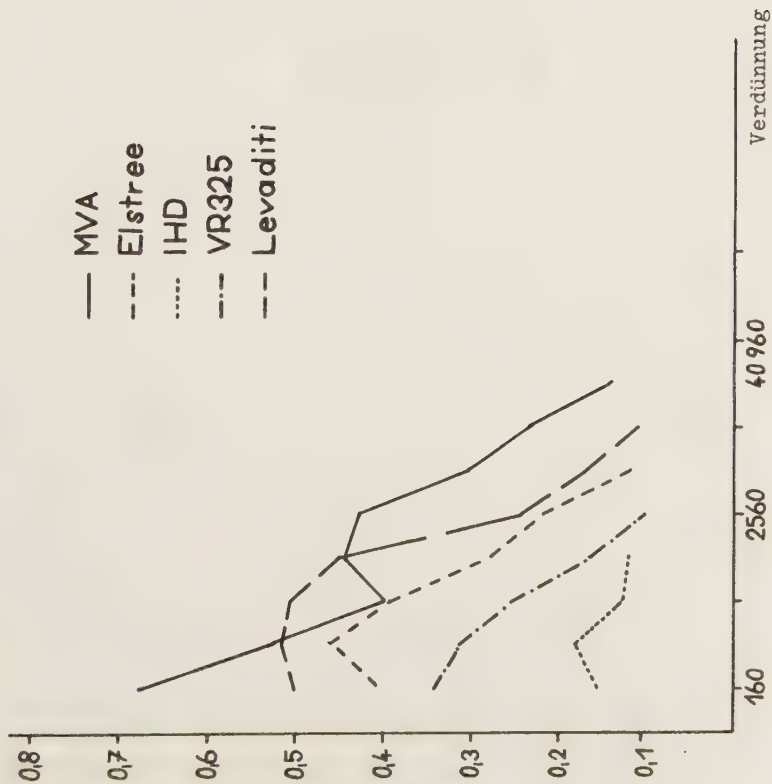
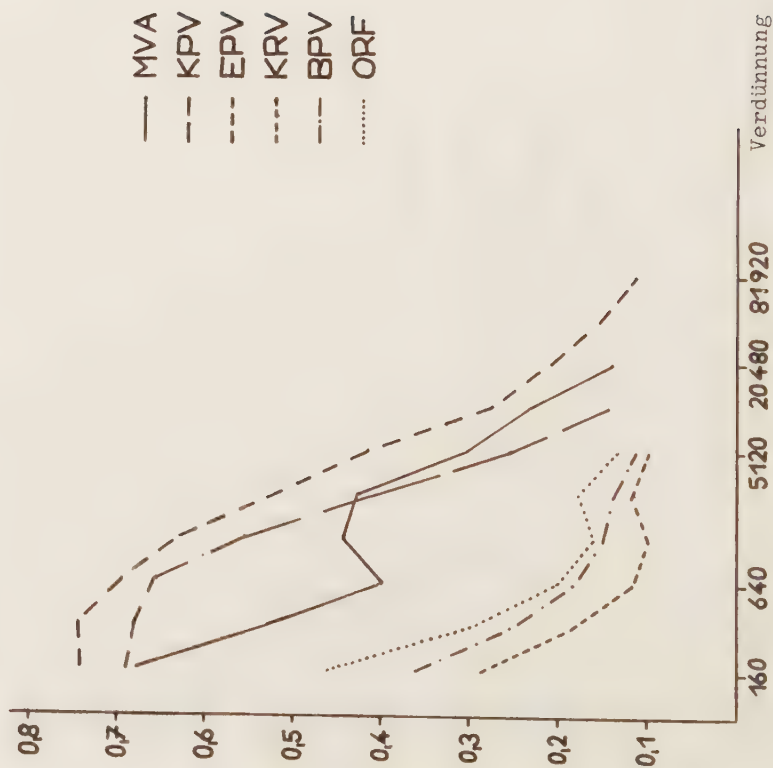


ABBILDUNG 11b : Titer im ELISA (1 :) von MAK 6/11 (Ascites) gegen
VV - MVA, KPv, EPV, KRV, BPV und Orf - Virus.

E



4.6 Trennung der Proteine von Vacciniavirusstämmen mittels SDS - PAGE

4.6.1 Virusreinigung

Durch die Ultrazentrifugation vorgereinigter Virussuspensionen im 20 - 60%igen Succrose - Dichtegradienten bildeten sich zwei dicht aneinanderliegende Virusbanden. Sie wurden getrennt gewonnen und elektronenmikroskopisch auf Partikelmorphologie und Reinheit untersucht. Die leichtere Bande enthielt intakte Pockenpartikel, Cores und Hüllfragmente, die etwas dichtere Bande ausschließlich komplette Virionen und kleine Virusaggregate. In der SDS - PAGE verhielten sich die Virusfraktionen beider Banden gleichartig (siehe auch Abbildung 12 : VV - MVA, obere und untere Bande) .

4.6.2 Auftrennung von Virusproteinen in der SDS - PAGE

Die VV - Stämme MVA, Elstree, IHD, VR 325 und das KPV wurden nach Reinigung im Zuckergradienten und Dissoziation ihrer Proteine in Probenpuffer vergleichend in der SDS - PAGE analysiert.

In silbergefärbten 10% AA - Gelen konnten 25 - 28 einzelne Proteine als Banden im MG - Bereich von 10 - 120 KD identifiziert werden, dagegen waren nach Auftrennung in 20 - 5% AA - Gradientengelen etwa 36 Proteine unterscheidbar.

Auswertung der Elektropherogramme der VV - Stämme :

Die Virusproteine wurden anhand der beiden mitgeführten MG - Standards (MG - Bereiche 14,2 - 66 KD und 29 - 205 KD) nach ihren MG benannt. Allen untersuchten Pockenviren gemeinsam und als Hauptvirusproteine bezeichnet wurden eine prominente Doppelbande im Bereich 58 - 62 KD, ein Protein mit ca. 42 KD und zwei weitere 24 und 20 KD - Proteinbanden. Die bei allen VV - Stämmen gefundene, intensiv gefärbte ca. 10 KD - Proteinbande war bei KPV in

den höheren MG - Bereich (12 - 15 KD) verschoben. Der IHD - Stamm unterschied sich von den übrigen untersuchten Stämmen durch die breite Proteinbande von ca. 30 KD und eine zusätzliche im 36 KD - Bereich. Nur bei KPV traten zusätzliche Proteine mit einer Größe von 95 - 100 KD auf.

Die Proteinmuster der VV - Stämme nach Auftrennung in der SDS - PAGE (10% AA - Gel) sind in der Abbildung 12 dargestellt.

4.7 Markierung von VV - Proteinen mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern im Western - Immunoblot

4.7.1 Amidoschwarzfärbung von Virusproteinen nach dem Transfer auf Nitrocellulose - Membranen

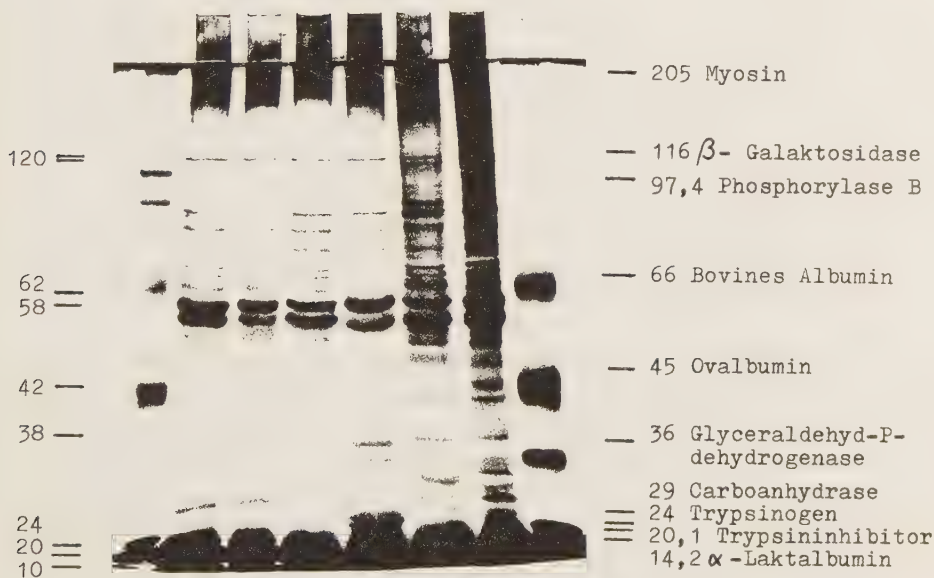
VV - Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in 10% AA - Gelen auf NC - Membranen transferriert und mit Amidoschwarz gefärbt. Unter den angegebenen Bedingungen ließen sich die Proteine aller MG quantitativ zu - friedenstellend vom Gel auf die Matrix übertragen. Als Kontrolle dienten die mitgeführten MG - Standards. Mit Amidoschwarz konnten etwa 15 einzelne Virusproteine im MG - Bereich 10 - 120 KD auf der NC - Membran identifiziert werden, das Auflösungsvermögen dieser Färbemethode war im Vergleich zur Silberfärbung der AA - Gele schwächer. Dagegen färbte Amidoschwarz sogenannte " Schmier - proteine " (Hintergrundfärbung) weniger intensiv als Silber an.

Für die folgenden Immunoblotting - Experimente wurden NC - Membranen nach dem Transfervorgang zerschnitten und zur Hälfte mit Amidoschwarz gefärbt. Dieses " Blot " diente als Vergleichsgrundlage zur Identifizierung der Virusproteine in " Immunoblots ".

ABBILDUNG 12 : Auftrennung der Virusproteine von VV - Stämmen und KPV in der SDS - PAGE (Bedingungen : 10% AA - Gel; 50V, 25 mA, 16 h; Silber - färbung) .

Virusprotein -
hauptbanden

Molekularge -
wichte $\times 10^3$ (KD)



MG - Standard (29 - 205 KD)

VV - MVA (obere Bande)

VV - MVA (untere Bande)

VV - Elstree

VV - IHD

KPV

VV - VR 325

MG - Standard (14,2 - 66 KD)

4.7.2 Optimierung der Methodik zur immunologischen Markierung von Virusproteinen mit Antikörpern

Die Bedingungen der immunologisch - enzymatischen Markierung von Virusproteinen auf NC - Membranen mußten vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen standardisiert werden.

Zum Abblocken der freien Bindungsstellen auf der NC - Membran vor der Inkubation mit der Ak - Probe können Detergentien oder Proteinlösungen dienen. Da TW 20 und NP 40 in den erforderlichen Konzentrationen ($> 0,05\%$) zur Abdissoziation gebundener Proteine von der Matrix führen können, wurden Proteinlösungen bevorzugt. An geeigneten Substanzen standen zur Verfügung : 3% Gelatine, 20% FKS, 20% NKS und 5% BSA; deren abblockende Eigenschaften wurden in Blottingexperimenten verglichen. Dazu wurden VV - Proteine und zusätzliche Bahnen mit BSA ($10\text{ }\mu\text{g}$ / Tasche) auf NC transferiert, mit den entsprechenden Block - Lösungen inkubiert und wie beschrieben weiterbehandelt. Eine ausreichende Blockierung war erreicht, wenn (1) Mäuse - bzw. Kaninchenhyperimmunserum BSA immunologisch nicht markierte und (2) Mäuse - bzw. Kaninchennormalseren Virusproteine auf der Matrix nicht " erkannten " . Mit 3% Gelatine oder 5% BSA als saturierende Lösung war dies nicht erreichbar; die unerwünschten unspezifischen Bindungen dagegen konnten mit 20% FKS oder 20% NKS vollständig eliminiert werden.

Die optimalen Verdünnungen der Ak - Proben wurden empirisch ermittelt. Der Verdünnungsfaktor sollte, um Hintergrund - färbungen zu reduzieren, möglichst groß, das Auflösungsvermögen aber maximal sein. Die Virusproteinbanden auf der NC - Membran wurden mit Mäusehyperimmunseren 1 : 250 und Kaninchenhyperimmunseren 1 : 150 quantitativ vollständig und von der Umgebung scharf abgesetzt markiert. Monoklonale Ak in Mäuseasciten wurden variierend in sehr geringer und sehr hoher Verdünnung (1 : 20 bis 1 : 1.000)

eingesetzt und die Inkubationszeiten von 90 min bis zu 16 Stunden (über Nacht im Kühlschrank) abgestuft, da das Bindungsverhalten (Affinität und Avidität) der Ak nicht bekannt war.

Die optimalen Konjugatverdünnungen wurden ebenfalls empirisch ermittelt. Eine quantitativ ausreichende Detektion bei minimaler Hintergrundfärbung gelang mit der Verdünnung 1 : 250. Der Ak - und Konjugatlösung wurde jeweils die in der Blocklösung enthaltene Substanz in geringeren Konzentrationen (1% Gelatine, 5% FKS, 5% NKS, 1% BSA) zugesetzt.

4.7.3 Immunologische Markierung von Virusproteinen mit Antikörpern in Kaninchen - anti - MVA - Hyperimmunserum

Mit Hyperimmunserum von Kaninchen gegen den VV - Stamm MVA ließen sich die Virusproteine aller VV - Stämme (MVA, Elstree, IHD, VR 325) und des KPV immunologisch anfärben. Folgende Virusproteine im MG - Bereich von 10 - 66 KD wurden bei allen OPV markiert :

Eine breite Bande von ca. 10 KD, zwei breite Proteinbanden von 25 - 30 KD, eine breitere mit ca. 36 KD und eine schmalere bei 58 - 62 KD. .

Die 36 KD - Bande war bei VV - Elstree, - IHD und beim KPV etwas zum höheren MG - Bereich verschoben. Nur bei VV - VR 325 konnte ein zusätzliches, schwach angefärbtes 45 KD - Protein identifiziert werden.

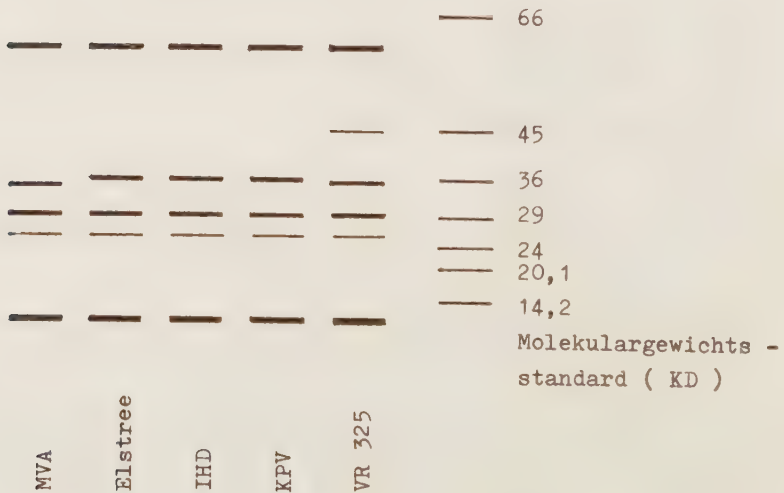
In Abbildung 13 sind die mit Kaninchen - anti - MVA - Hyperimmunserum immunologisch markierten VV - Proteine skizziert.

Die polyklonalen anti - MVA - Ak im Kaninchenhyperimmunserum markierten die allen VV - Stämmen gemeinsamen Virusproteine. Diese Methodik war somit nicht zur Differenzierung zwischen VV - Stämmen, jedoch zum Nachweis von Pockenanti -

genen geeignet. Beim Vergleich aufgetrennter, silber - gefärbter Virusproteine mit immunologisch markierten Virusproteinen fiel ferner auf, daß offensichtlich nicht alle Haupt - VV - Proteine immunologisch wesentlich waren.

Die Kaninchen - Ak erkannten von den Proteinen mit den MG 10 KD, 20 und 24 KD, 42 und 58 - 62 KD nur das 10 KD - Protein und die obere der 58 - 62 KD - Doppelbande (vgl. 4.6.2) . Mit der Silberfärbung nur schwach dar - stellen ließen sich die Ag im Bereich 23 - 30 KD und 36 KD. Das bei VV - VR 325 zusätzlich markierte 45 KD - Protein unterschied sich in der SDS - PAGE nicht von den Proteinen der übrigen VV - Stämme.

ABBILDUNG 13 : Schema der im Immunoblot - Verfahren markierten VV - Proteine (mit anti - MVA - Kaninchen - hyperimmunserum) verschiedener VV - Stämme.

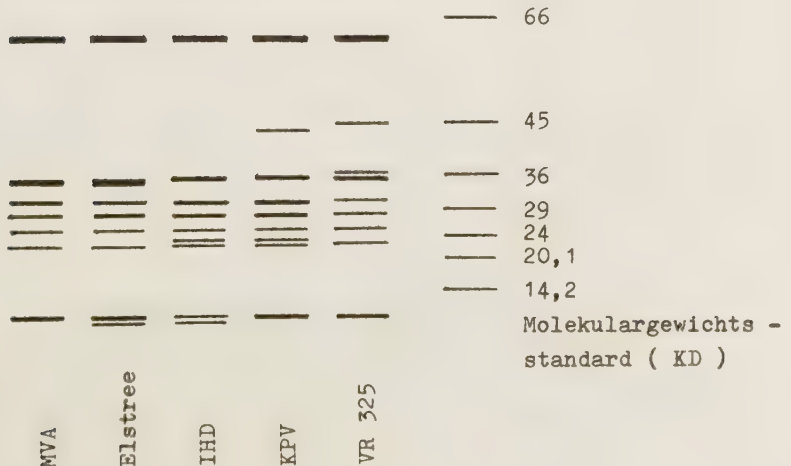


4.7.4 Immunologische Markierung von VV - Proteinen mit Antikörpern in anti - MVA - Mäusehyperimmunseren

Mäusehyperimmunserum gegen MVA reagierte im Immunoblot - Verfahren mit Virusproteinen aller VV - Stämme im Bereich von 10 - 66 KD.

Eine sehr starke Farbreaktion erzeugten die Ak mit zwei Proteinen um 30 KD und einer breiten Bande bei 58 - 62 KD. Mit geringerer Intensität wurden die 10 KD - Bande und drei kleinere Banden von 24 - 29 KD markiert. Nur beim VV - VR 325 und beim KPV traten auch Proteine von ca. 45 KD auf; bei VV - Elstree und - IHD war die 10 KD - Bande als Doppelbande vorhanden. Die Farbtintensität der ca. 30 KD - Doppelbande von VV - VR 325 war schwächer als bei den übrigen Stämmen, die 36 und 45 KD - Proteine dagegen deutlicher dargestellt. Die mit anti - MVA - Mäusehyperimmunserum markierten VV - Proteine sind in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

ABBILDUNG 14 : Schema der im Immunoblot - Verfahren markierten Proteine verschiedener VV - Stämme (mit anti - MVA - Mäusehyperimmunserum) .



Die Antigenmuster der mit anti - MVA - Ak markierten VV - Stämme, einschließlich des KPV, glichen sich weitgehend; stammspezifische Differenzen konnten nur sehr bedingt interpretiert werden.

Die Antigenmuster, darstellbar nach Markierung mit Mäuse - bzw. Kaninchenhyperimmunserum, waren sich sehr ähnlich : Die Mäuse - Ak markierten insgesamt mehr der Virusproteine als die Kaninchen - Ak; die identifizierten Ag färbten sich unterschiedlich stark an. Die Hauptantigene 10 KD und die obere der 58 - 62 KD - Doppelbande waren identisch. Versuche das Auflösungsvermögen in Immunoblots mit Kaninchen - Ak durch Erhöhung der Ak - Konzentration und Variation der Inkubationszeiten zu steigern, führten nicht zur Markierung zusätzlicher Virusproteine.

4.7.5 Markierung von VV - Proteinen mit Antikörpern in Mäusehyperimmunseren gegen verschiedene VV - Stämme

Mit Hyperimmunseren von Mäusen gegen VV - Elstree, - IHD, - VR 325 und KPV ließen sich Muster von Virusproteinen markieren, die untereinander und mit denen nach Verwendung von anti - MVA - Ak fast identisch waren. Unterschiede traten aber in der Farbintensität bei Proteinen verschiedener Stämme auf.

Das anti - VV - IHD - kontrastierte wie das anti - MVA - Serum. Die anti - Elstree -, - VR 325 - und - KPV - Seren markierten bei allen VV - Stämmen ein zusätzliches Protein im 92 KD - Bereich. Das anti - VV - Elstree - Serum wie - derum färbte bei allen Stämmen zusätzlich ein ca. 84 KD - Protein und die 58 - 62 KD - Doppelbande an.

4.7.6 Versuche zur immunologischen Markierung von VV - Proteinen mit monoklonalen Antikörpern gegen MVA

Die MAK der Klone 5/1, 5/2, 6/8 und 6/11 wurden als un -

gereinigte Mäuseasciten für die Western - Immunoblot - Versuche verwendet.

Lediglich mit den Asciten der MAK - Klone 5/2 und 6/8 (Verdünnung 1 : 20) konnte eine schwache immunologische Reaktion auf der NC - Membran erzeugt werden. Mit geringer Farbintensität markierten die MAK beider Klone bei allen VV - Stämmen ein Virusprotein im Bereich 58 - 62 KD. Dieses Protein stellte vermutlich die obere der 58 - 62 KD - Doppel - bande dar (vgl. auch die Abbildungen 12, 13, 14) , die auch von polyklonalen Ak in Kaninchen - und Mäusehyper - immunseren markiert wurde.

5. DISKUSSION

Über die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Ortho - pockenviren, wie generell gegen Pockenviren, liegen einige Berichte aus jüngster Zeit vor (DALES et al., 1983; KITAMOTO et al., 1984; ROUMILLAT et al., 1984; RODRIGUEZ et al., 1985; WILTON et al., 1986). Sie machen aber deutlich, daß zwar die Herstellung von Hybri - dom - Zellen keine Schwierigkeiten bereitet, die Se - lektion von Klonen mit Sekretion der gewünschten Art von MAK jedoch bei den großen, mit vielen determinieren - den Antigenen besetzten Pockenviren langwierig ist.

Aus einer Fusion von Milzzellen der mit dem VV - Stamm MVA hyperimmunisierten Mäuse mit der Mäusemyelomzelllinie P3 - X63 - Ag8 wuchsen zu 35% Kolonien heran, von denen im Screening - ELISA 10% Ak - positiv reagierten. Nach Vermehrung dieser Zellen, Klonierung und Anreicherung in Mäuseascitestumoren konnten letztendlich fünf per - manent Ak - sezernierende Hybridoma - Klone isoliert werden.

Als Screening - Test für Hybridoma - Ak gegen OPV wurde der indirekte ELISA gewählt, da er ohne großen technischen Aufwand rasch Ergebnisse liefert und bereits die geringe Konzentration von 10 - 50 pg gebundener Ak nachweisbar ist (POLLOCK et al., 1984) .

Mit den gewonnenen fünf MAK - sezernierenden Klonen galt es einerseits, die Methodik einer Anreicherung und Reini - gung für Pocken - MAK zu erarbeiten, andererseits den Weg einer brauchbaren Charakterisierung und Spezifizierung für die serologische Nutzung der MAK zu ermitteln.

Keiner der fünf verfügbaren MAK wies in vitro virusneu - tralisierende Eigenschaften auf. RODRIGUEZ et al. (1985) beschrieben dagegen solche MAK, die gegen ein 14 KD -

Hüllprotein gerichtet sein sollen. Diese Ak verhinderten nicht die Haftung und die Penetration des Virus in die Zelle, sondern hemmten sein Uncoating in der Zelle.

Vier der fünf Ak - Klone, die von zwei verschiedenen " Mutterkolonien " abstammten, produzierten MAK der IgM - Klasse; bei einem Klon konnte die Ig - Klasse nicht sicher bestimmt werden. Ähnliche Beobachtungen beschreibt HUEBERT (1985) .

Die MAK der in Mäuseasciten vermehrten Klone wurden über Verfahren der Affinitätschromatographie gereinigt. Ziel war es dabei, antigenspezifisch reagierende von unspezifischen, an das Testplattenmaterial klebenden Ascites - bestandteilen zu trennen.

Beim Versuch der Reinigung mit Prot A - Sepharose wurden die IgM - Ak nicht gebunden. Nach der Elution der Chromatographiesäule bei pH 3,0 ließen sich mit dem anti - Maus Konjugat Ig mit starker unspezifischer Aktivität nachweisen. Daraufhin wurde versucht, über eine Säulenkombination die von Prot A nicht gebundenen IgM - Ak durch Adsorption der Kohlenhydratreste an Con A - Sepharose zu isolieren (LEINIKKI et al., 1978) . IgM - Ak wurden von Con A allerdings nur unvollständig adsorbiert. Auch nach Halbierung der eingesetzten Ascitesmenge ließen sich im ELISA mit dem anti - Maus - IgM Konjugat sowohl im Durchlauf als auch im Eluat IgM - Ak nachweisen. Diese Beobachtung ließ sich jedoch in der SDS - PAGE, die ohne reduzierendes 2-ME angesetzt war, nicht nachvollziehen. Außerdem zeigte sich hier, daß Prot A die IgG - Subklassen nicht quantitativ aus dem Ascites entfernte. Für das Bindungsverhalten der Ascites - Immunglobuline sind verschiedene Möglichkeiten zu diskutieren :

(1) Bei der Vermehrung der Hybridoma - Klone hat ein " switch " bei der Produktion der schweren Ketten von μ (IgM) auf γ (IgG) stattgefunden. Dadurch liegt eine Mischpopulation von IgM - und IgG - Ak sezernierenden Zellen vor. Diese wären durch Reklonierung mit der Limi -

ting Dilution - Methode zu trennen.

(2) Aufgrund der genetischen Instabilität der Tumorzellen werden nach dem Verlust von Nukleotidsequenzen irreguläre Immunglobuline produziert. Defekte an den Kohlenhydratresten oder an den Fc - Stücken der konstanten Ak - Regionen führen zu geringerer Affinität an die Reaktionspartner Con A bzw. Prot A.

(3) Die Hybridoma - Zellklone produzieren unvollständige Ig. Es werden solitäre schwere und leichte Ketten freigesetzt, die nicht durch Disulfidbrücken zu kompletten Molekülen zusammengesetzt sind. Damit wäre der Nachweis dissoziierter Ig - Ketten in der SDS - PAGE erklärbar (Lit. bei POLLOCK et al., 1984) .

Zur serologischen Charakterisierung von OPV im ELISA wurden die MAK als ungereinigte Mäuseasciten verwendet. Bei jedem Test wurden negative Kontrollplatten identisch beschickt und die Ausgangsverdünnungen der MAK so gewählt, daß falsch positive Reaktionen auf der Kontrollplatte nicht mehr auftraten. MALTSEVA et al. (1985) gingen ebenso vor.

Vier MAK banden im ELISA an alle untersuchten Pocken - antigene. Anhand der ELISA - Titer waren drei Gruppen ähnlich reagierender Pockenvirusspezies bzw. - stämme erkennbar :

Vergleichbar hohe Titer wie gegen das homologe Antigen VV- MVA wurden mit KPV und EPV, etwas niedrigere mit den VV - Stämmen Elstree, VR 325, IHD und Levaditi erzielt. Gegen BPV, KRV und das Orf - Virus wurden die niedrigsten Titer gemessen.

Die ELISA - Titer gegen das homologe VV - MVA unterschieden sich deutlich von denen gegen die übrigen Stämme. Eine Differenzierung der mit MVA sehr eng verwandten VV - Stämme von den übrigen OPV war mit Hilfe dieses ELISA jedoch nicht möglich. Ebensowenig war das Orf - Virus, das dem serologisch nicht verwandten Genus Parapoxvirus

angehört, sicher von OPV abzugrenzen.

MAK 5/2 reagierte mit allen Virusstämmen am stärksten. Dagegen reagierten die Ak - Klone 5/1, 6/8 und 6/11 mit den verschiedenen Pockenantigenen mit unterschiedlicher Priorität. Beispielsweise resultierten die höchsten Titer nicht gegen das MVA - Antigen, sondern mit 5/1 gegen VV - Levaditi und KPV, bei 6/8 und 6/11 gegen EPV. Somit ließen sich mit diesen MAK innerhalb der OPV - Gruppe nur geringe, nicht signifikante Spezifitätsunterschiede erkennen; ebenso gegen den Vertreter der Parapockenviren. Dieser MAK - ELISA scheint deshalb mehr zum Nachweis von Pockenantigenen allgemein, nicht dagegen zu deren Differenzierung geeignet zu sein. Vermutlich sind vor allem auch die vier MAK gegen ein Pockenantigen gerichtet, das allen OPV und den Parapocken gemeinsam ist.

Ein wesentliches Ziel der eigenen Versuche war schließlich die Erarbeitung einer Methodik, die Proteine von OPV zu identifizieren und eine serologische Definition mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern zu erreichen.

Die Auftrennung der OPV - Proteine erfolgte nach LAEMMLI (1970) in 10% AA - Gelen. In den silbergefärbten Gelen waren 25 - 28 einzelne Polypeptide mit MG von 10 - 120 KD nachweisbar. OIE und ICHIHASHI (1981) fanden bei VV 39 Polypeptide mit MG von 13 - 110 KD nach in vitro radioaktiver Markierung. SAROV und JOKLIK (1972) beschrieben ebenfalls nach Autoradiographie 30 Polypeptide.

Die prominente Virusprotein - Doppelbande von ca. 58 und 62 KD wurde von SAROV und JOKLIK (1972) auf 58,2 und 63 KD geschätzt (OIE und ICHIHASHI, 1981 : 57 und 61 KD; ESSANI und DALES, 1979 : 60 und 62 KD) ; sie macht zusammen 42,9% der Virusproteinmasse aus und befindet sich

im Core des Virus.

Eine breite Proteinbande mit 42 KD wurde von SAROV und JOKLIK (1972) als zwei einzelne Glykopolypeptide mit 41 und 39 KD beschrieben, die zusammen 9,1% der Virus - masse bilden (OIE und ICHIHASHI, 1981 : 37 KD) .

Im Bereich von 24 und 20 KD wurden 23 KD - sowie 18,5 und 17 KD - Coreproteine bzw. sieben einzelne Polypeptide im MG - Bereich von 27 bis 21,5 KD beschrieben.

Die intensiv gefärbte Bande am unteren Rand des Gels mit ca. 10 KD dürfte dem basischen Phosphoprotein mit 11 KD entsprechen. Dieses stellt nach SAROV und JOKLIK (1972) allein 11,4% der Virusmasse dar und liegt an der Virusoberfläche (HILLER und WEBER, 1982) .

Zahlreiche kleinere Viruspolypeptidbanden der eigenen Analysen sind mit den Ergebnissen der Autoren vergleich - bar. Kleine Unterschiede in den MG ergeben sich durch die unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen.

Die in den eigenen Untersuchungen analysierten VV - Stämme MVA, Elstree, IHD, VR 325 sowie das KPV waren sich in ihren Elektropherogrammen sehr ähnlich. Bei KPV fielen zusätzliche schmale Proteinbanden im Bereich von 97 - bis 105 KD auf. VV - IHD unterschied sich von den übrigen OPV durch eine zusätzliche breite Bande bei 30 KD und eine weitere bei ca. 36 KD. SAROV und JOKLIK (1972) beschrieben für den WR - Stamm von VV ein wichtiges entsprechendes Oberflächenprotein, während OIE und ICHIHASHI (1981) bei VV - IHD zahlreiche einzelne Polypeptide in diesem MG - Bereich feststellten.

Die dissoziierten VV - Proteine wurden nach der Elektro - phorese auf Nitrocellulose - Membranen übertragen.

Die Transferbedingungen mußten so gewählt werden, daß sich Polypeptide im MG - Bereich 10 - 120 KD quantitativ zufriedenstellend übertrugen. Die letztendlich gewählte Methodik war ein Kompromiß, da es optimale Bedingungen für den gleichzeitigen Transfer von Proteinen hoher und

niedriger MG nicht gibt.

Um eine spezifische Bindung von Ak an isolierte Virus -
proteine nachweisen zu können, muß zunächst das Protein -
bindungsvermögen der NC - Membran selbst blockiert werden.
In den vorliegenden Untersuchungen waren als absättigende
Lösung 20% FKS und 20% NKS am besten geeignet. 3% BSA,
wie TOWBIN et al. (1979) empfahlen, blieb unbefriedigend.

Mit Kaninchen - anti - MVA - Hyperimmunserum ließen sich
bei allen VV - Stämmen und bei KPV identische Viruspoly -
peptide im MG - Bereich von 10 - 62 KD markieren. Die
polyklonalen Ak der Kaninchen erkannten Proteine mit
10, 24, 30, 34 und 62 KD, beim VV - Stamm VR 325 zusätz -
lich ein ca. 45 KD - Protein. Die Mäusehyperimmunseren
markierten insgesamt mehr Virusproteine als die Kaninchen -
seren. Identisch waren die 10, 24, 30, 34 und 62 KD - Pro -
teine, zusätzlich zeigten sich Banden bei ca. 26 und 32 KD.
Die Antigenmuster der VV - Stämme Elstree, IHD und VR 325
differierten nur geringfügig von dem des MVA - Virus.
Wiederum war mit Mäuseantikörpern ein ca. 45 KD - Protein
bei VR 325 nachweisbar; bei IHD war ein 25 KD - und das
10 KD - Protein als Doppelbande vorhanden.

Versuche, das Auflösungsvermögen beim Einsatz von Kanin -
chenantisera zu steigern, führten nicht zum Erfolg. Da
die Kaninchen und Mäuse, von denen die Immunseren stammten,
mit dem gleichen Virusmaterial immunisiert worden waren
und tierartliche Unterschiede nicht erwartet wurden, lassen
sich die Unterschiede möglicherweise auf die Ak - Kon -
zentration in den Seren und die Qualität der Konjugate
zurückführen. Allerdings wiesen die Kaninchenserum höhere
ELISA - Titer als die der Mäuse auf.

WILTON et al. führten 1986 mit Mäusehyperimmunseren Immu -
noblotting - Experimente gegen den VV - Stamm IHD durch
und erzielten vergleichbare Ergebnisse. Das 94 KD - Anti -
gen, als Precursor des 62 KD - Coreproteins beschrieben

(MOSS und ROSENBLUM, 1973) , fehlte gänzlich. Dagegen wirkte offensichtlich in den hier durchgeführten Untersuchungen das 10 KD - Virusprotein stark immunogen. HILLER und WEBER (1982) konnten mit dem isolierten 11 KD - Phosphoprotein Kaninchen immunisieren und mit den gewonnenen Ak selektiv dieses Ag im Immunoblot markieren.

Die mit polyklonalen Ak markierbare Anzahl an Viruspoly - peptiden entspricht nicht der potentiell möglichen Zahl der Antigene von Pockenviren. Dies kann einerseits auf die teilweise Denaturierung der Proteine durch SDS zu - rückgeführt werden, da Tertiär - und Quartärstrukturen des Virus nach Auftrennung der Proteine im Gel nicht re - naturierbar sind. Andererseits sind bei der großen An - zahl von Pockenantigenen wahrscheinlich einige immuno - dominant (ROUMILLAT et al., 1984) .

Nach Etablierung der Versuchsbedingungen wurden die MAK im Immunoblot untersucht. Nur die Ak - Klone 5/2 und 6/8 reagierten in einer Verdünnung der Asciten von 1 : 20 schwach mit einem Ag bei ca. 62 KD. Versuche, die Reaktion zu verstärken, waren nicht erfolgreich. Weder Änderungen der Ak - Konzentration noch Variation der Inkubations - zeiten (nach TOWBIN und GORDON, 1984) führten zu dem gewünschten Ergebnis. Als Ursache der unbefriedigenden Bindungseigenschaften der MAK im Immunoblot kommt eine Denaturierung des Antigens durch SDS und 2-ME bzw. eine Konformationsänderung des Epitops in Betracht. Vermutlich wurde die schwerere der 58 - 62 KD Virusprotein - Doppel - bande markiert. Da dieser Hauptbestandteil der Core - proteine mit 58,2 und 63 KD (SAROV und JOKLIK, 1972) bzw. 60 und 62 KD (ESSANI und DALES, 1979) bei allen OPV und in ähnlicher Form bei Pockenviren anderer Genera nachweisbar ist, wäre die Vermutung anhand der ELISA - Ergebnisse bestätigt, daß die MAK gegen ein gemeinsames Familienantigen gerichtet sind. Ein weiteres Virusprotein im MG - Bereich 58 - 62 KD ist das Oberflächentubulus -

protein mit 58 KD (STERN und DALES, 1976a) .

1986 erzeugten WILTON et al. eine breite Palette an MAK gegen den VV - Stamm IHD. Von 23 in der Immunofluoreszenz positiven MAK reagierten lediglich 13 auch im Western - Immunoblot. Allein sieben davon markierten ein 32 KD - Antigen. Die Autoren vermuteten Unterschiede in der Avidität der Ak oder das Erkennen verschiedener Epitope auf dem 32 KD - Polypeptid. Auffälligerweise reagierten die MAK (u.a. gegen Proteine mit 28, 35, 85 KD gerichtet) mit anderen Antigenen als den von polyklonalen Ak bevorzugt markierten.

Mit Hilfe der MAK gegen Affenpockenvirus (ROUMILLAT et al., 1984) waren Affenpockenvirusisolate sicher von Variola -, Vaccinia - und Kuhpockenfeldstämmen abgrenzbar, da diese gegen ein nur bei Affenpockenvirus vorliegendes 15 KD - Polypeptid gerichtet waren.

Die virusneutralisierenden MAK von RODRIGUEZ et al. (1985) konnten VV - Elstree, KPV und Kuhpockenvirus nicht differenzieren, da sie ein gemeinsames 14 KD - Hüllprotein erkannten.

Aus den Ergebnissen der genannten Autoren und den eigenen Untersuchungen wird deutlich, daß bei der Immunreaktion gegen OPV offensichtlich Antigene sowohl der Virushülle (RODRIGUEZ et al., 1985) als auch der Innenstrukturen (WILTON et al., 1986) eine Rolle spielen.

Die engen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb des Genus OPV werden durch die vorliegenden Ergebnisse unterstrichen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Nach der Fusion von Milzzellen hyperimmuner Mäuse mit einer permanenten Mäusemyelomzelllinie konnten monoklonale Antikörper gegen den VV - Stamm MVA isoliert werden.

Mit Hilfe eines ELISA wurden die vier Ak - Klone als IgM charakterisiert und daraufhin mit einem kombinierten Protein A - / Concanavalin A - Affinitätschromatographie - verfahren gereinigt.

Eine völlige Trennung der als Mäuseascites angereicherten MAK von IgG im Ascites zur Beseitigung aller unspezifischen ELISA - Reaktionen war nicht erreichbar.

Die Ak - Klone wurden auf ihre serologische Spezifität gegen verschiedene OPV im indirekten ELISA geprüft. Das Testsystem war zum Nachweis von OPV - Antigenen allgemein gut geeignet, jedoch nicht zur Differenzierung von OPV untereinander sowie zur Abgrenzung gegen Parapockenviren (Orf - Virus) .

Methoden zur Auftrennung und Anfärbung von VV - Proteinen in der SDS - PAGE wurden erprobt.

Die optimalen Bedingungen zum Transfer aufgetrennter Virus - proteine vom AA - Gel auf NC - Membranen und deren immuno - logisch - enzymatische Markierung (Immunoblotting) wurden erarbeitet.

Im Immunoblot - Verfahren waren die Immunsereen von Kanin - chen und Mäusen gegen ein breites Spektrum von OPV - Proteinen sowohl der Virushülle als auch des Core ge - richtet. Die gewonnenen MAK dürften gegen ein Antigen des Viruscore gerichtet sein.

Die Untersuchungen bestätigten die Verwandtschaftsver - hältnisse innerhalb der Familie Poxviridae, insbesondere die sehr engen innerhalb des Genus Orthopoxvirus.

S U M M A R Y

Attempts to serological characterization of Orthopox - virus by monoclonal antibodies

By fusion of spleen cells of hyperimmunized mice with a permanent mouse myeloma cell line monoclonal antibodies against the vaccinia virus strain MVA could be isolated.

With an ELISA four MABs were characterized as IgM and were purified with combined protein A- / concanavalin A- affinity chromatography.

Complete separation of mice ascitic fluid enriched MABs from IgGs in ascitic fluid to exclude all unspecific reactions in the ELISA was not attainable.

The MABs were analyzed in an indirect ELISA for their serological specificity to different orthopoxviruses. This system was qualified for detection of common ortho - poxvirus antigens, but failed to differentiate orthopox - viruses among another and from parapoxviruses (orf virus) .

Methods of separating and staining vaccinia virus proteins in SDS - PAGE were proved.

Optimal conditions of transferring separated virus proteins from acrylamide gels to nitrocellulose membranes and their immunological detection with enzymes were elaborated.

In immunoblotting immune sera of rabbits and mice proved to be directed against a broad spectrum of orthopoxvirus proteins both in the envelope and in the core of the virus. The derived MABs presumably reacted with an antigen of the virus core.

These investigations confirmed the relationships within the family of Poxviridae, especially within the very closely related members of the genus of Orthopoxviruses.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- APPLEYARD, G., H.T.ZWARTOUW, J.C.N.WESTWOOD, 1964a :
A protective antigen from the poxviruses :
I. Reaction with neutralizing antibody.
Brit.J.Exp.Pathol. 45, 150 - 161
- APPLEYARD, G., J.C.N.WESTWOOD, 1964b :
A protective antigen from the poxviruses :
II. Immunization of animals.
Brit.J.Exp.Pathol. 45, 162 - 173
- APPLEYARD, G., A.J.HAPEL, E.A.BOULTER, 1971 :
An antigenetic difference between intracellular
and extracellular rabbitpoxvirus.
J.Gen.Virol. 13, 9 - 13
- ARCHARD, L.C., M.MACKETT, D.E.BARNES, K.R.DUMBELL, 1984 :
The genome structure of cowpox virus white pox
variants.
J.Gen.Virol. 65, 875 - 886
- ARITA, I., D.A.HENDERSON, 1976 :
Monkeypox and whitepox viruses in West and Central
Africa.
Bull.WHO 53, 347 - 353
- ARITA, M., I.TAGAYA, 1980 :
Virion polypeptides of poxviruses.
Arch.Virol. 63, 209 - 225
- BACHMANN, P.A., 1979 :
Rotavirus in Faeces : Erfahrungen mit dem Enzyme
Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .
Zbl.Vet.Med.B 26, 835 - 842

BAXBY, D., 1975a :

Identification and interrelationships of the
variola / vaccinia subgroup of poxviruses.

In : Prog.med.Virol. 19, 215 - 246

Karger, Basel

BAXBY, D., 1975b :

Laboratory characteristics of British and Dutch
strains of cowpox viruses.

Zbl.Vet.Med.B 22, 480 - 487

BAXBY, D., 1977 :

Poxvirus hosts and reservoirs.

Arch.Virol. 55, 196

BAXBY, D., B.GHABOOSI, 1977 :

Laboratory characteristics of poxviruses isolated
from captive elephants in Germany.

J.Gen.Virol. 37, 407 - 414

BAXBY, D., A.D.OSBORNE, 1979 :

Antibody studies in natural bovine cowpox.

J.Hyg. 83, 425 - 428

BAXBY, D., W.B.SHACKLETON, J.WHEELER, A.TURNER , 1979 :

Comparison of cowpox - like viruses isolated from
European zoos.

Arch.Virol. 61, 337 - 340

BAXBY, D., 1982 :

The surface antigens of orthopoxviruses detected by
cross neutralization tests on cross - absorbed
antisera.

J.Gen.Virol. 58, 251 - 262

- BEN - HAMIDA, F., A. PERSON, G. BEAUD, 1983 :
Solubilization of a protein synthesis inhibitor
from vaccinia virus.
J. Virol. 45, 452 - 455
- CHALLBERG, M. D., P. T. ENGLUND, 1979 :
Purification and properties of the deoxyribonucleic
acid polymerase induced by vaccinia virus.
J. Biol. Chem. 254, 7812 - 7819
- CHANG, A., D. H. METZ, 1976 :
Further investigation on the mode of entry of
vaccinia virus into cells.
J. Gen. Virol. 32, 275 - 282
- CZERNY, C. P., 1986 :
Zellkulturadaptierung des humanen Coronavirus OC - 43
und dessen epizootiologische Bedeutung.
Vet. Med. Diss., München
- DALES, S., M. B. A. OLDSTONE, 1982 :
Localization at high resolution of antibody induced
mobilization of vaccinia virus haemagglutinin and
the major histocompatibility antigens on the plasma
membranes of infected cells.
J. Exp. Med. 156, 1435 - 1447
- DALES, S., R. S. FUJINAMI, M. B. A. OLDSTONE, 1983 :
Infection with vaccinia virus favors the selection
of hybridomas synthesizing autoantibodies against
intermediate filaments, one of them cross - reacting
with the virus haemagglutinin.
J. Immunol. 131, 1546 - 1553
- DIMMOCK, N. J., 1984 :
Mechanisms of neutralization of animal viruses.
J. Gen. Virol. 65, 1015 - 1022

EPP,C., 1961 :

Über das Antikörperbild des Menschen bei normalem
und gestörtem Verlauf einer Pockenschutzimpfung.
Arch.Hyg. 145, 256

ESPOSITO,J.J., J.F.OBIJESKI, J.H.NAKANO, 1977 :

Serological relatedness of monkeypox, variola and
vaccinia viruses.

J.Med.Virol. 1, 35 - 47

ESPOSITO,J.J., J.F.OBIJESKY, J.H.NAKANO, 1978 :

Orthopoxvirus DNA : Strain differentiation by
electrophoresis of restriction endonuclease
fragmented virion DNA.

Virology 89, 53 - 66

ESPOSITO,J.J., J.F.OBIJESKY, J.H.NAKANO, 1985 :

Can variola - like viruses be derived from monkey -
pox virus? An investigation based on DNA mapping.

Bull.WHO 63, 695 - 703

ESSANI,K., S.DALES, 1979 :

Biogenesis of vaccinia : Evidence for more than
100 polypeptides in the virion.

Virology 95, 385 - 394

ESTEBAN,M., C.V.CABRERA, J.A.HOLOWCZAK, 1985 :

Biochemical and electron microscopic studies on
the transscription of vaccinia DNA by RNA polymerase
from Escherichia coli : Localization and characteri -
zation of transscriptional complexes.

J.Virol.Meth. 12, 111 - 135

EY,R.L., S.J.Prowse, C.R.JENKIN, 1978 :

Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins
from mouse serum using Protein A - Sepharose.

Immunochemistry 15, 429 - 436

FENNER, F., 1979 :

Portraits of viruses : The poxviruses.
Intervirology 11, 137 - 157

FOGLESONG, P.D., W.R. BAUER, 1984 :

Effects of ATP and inhibitory factors on the
activity of vaccinia virus type I topoisomerase.
J.Virol. 49, 1 - 8

GISPEN, R., B. BRAND - SAATHOF, 1974 :

Three specific antigens produced in vaccinia,
variola and monkeypox infections.
J.Infect.Dis. 129, 289 - 295

GOLINI, F., J.R. KATES, 1985 :

A soluble transscription system derived from
purified vaccinia virions.
J.Virol. 53, 205 - 213

HANES, B.D., D. RICKWOOD, 1981 :

Gel electrophoresis of proteins : A practical
approach.
IRL Press, London

HARPER, L., H.S. BEDSON, A. BUCHAN, 1979 :

Identification of orthopox viruses by polyacrylamide
gel electrophoresis of intracellular polypeptides.
Virology 93, 433 - 444

HERRLICH, A., 1967 :

Die Pocken.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

HILLER, G., H. EIBL, K. WEBER, 1981a :

Acyl - bis (monoacylglycero) phosphate, assumed
to be a marker for lysosomes, is a major phospho -
lipid of vaccinia virions.
Virology 113, 761 - 764

HILLER, G., H.EIBL, K.WEBER, 1981b :

Characterization of intracellular and extracellular vaccinia virus variants : N_1 - Isonicotyl - N_2 - 3 - Methyl - 4 - Chlorobenzylhydrazine interferes with cytoplasmic virus dissemination and release.

J.Virol. 30, 903 - 913

HILLER, G., K.WEBER, 1982 :

A phosphorylated basic vaccinia virion polypeptide of molecular weight 11,000 is exposed on the surface of mature particles and interacts with actin - containing cytoskeletal elements.

J.Virol. 44, 647 - 657

HOLOWCZAK, J.A., W.K.JOKLIK, 1967 :

Studies on the structural proteins of vaccinia viruses : I. Structural proteins of the virions and cores.

Virology 33, 717 - 725

HRUBY, D.E., L.A.BALL, 1982 :

Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene.

J.Virol. 43, 403 - 409

HUEBERT, P., 1985 :

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Rotaviren und ihre Anwendung in der Diagnostik.

Vet.Med.Diss., München

ICHIHASHI, Y., S.DALES, 1971 :

Biogenesis of poxviruses : Interrelationship between haemagglutinin production and polycaryocytosis.

Virology 46, 533 - 543

ICHIHASHI, Y., 1977 :

Vaccinia - specific haemagglutinin.

Virology 76, 527 - 538

ICHIHASHI, Y., M.OIE, 1980 :

Adsorption and penetration of the trypsinized
vaccinia virion.

Virology 101, 50 - 60

ICHIHASHI, Y., T.TSURUHARA, M.OIE, 1982 :

The effect of proteolytic enzymes in the infecti -
vity of vaccinia virus.

Virology 122, 279 - 289

ICHIHASHI, Y., M.OIE, T.TSURUHARA, 1984 :

Location of DNA - binding proteins and disulfide -
linked proteins in vaccinia virus structural
elements.

J.Virol. 50, 929 - 938

IKUTA, K., H.MIYAMOTO, S.KATO, 1979 :

Two components responsible for haemagglutination
in vaccinia and cowpox viruses.

Virology 96, 327 - 331

IKUTA, K., H.MIYAMOTO, S.KATO, 1980 :

Biochemical studies on early cell surface antigen
induced by vaccinia and cowpox viruses.

J.Gen.Virol. 47, 227 - 232

JOHNSTONE, A., R.THORPE, 1982 :

Immunochemistry in practice.

Blackwell Scientific Publications, Oxford

JOKLIK, W.K., 1962 :

The purification of four strains of poxvirus.

Virology 18, 9 - 18

JONES, E.V., B. MOSS, 1984 :

Mapping of the vaccinia virus DNA polymerase gene by marker rescue and cell - free translation of selected RNA.

J. Virol. 48, 72 - 77

KAERBER, G., 1931 :

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480 - 483

KEARNEY, J.F., A. RODBRUCH, B. LIESEGANG, K. RAJEWSKY, 1979 :

A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting cell lines.

J. Immunol. 123, 1648 - 1550

KATES, J.R., B. R. McAUSLAN, 1967 :

Poxvirus DNA - dependent RNA polymerase.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 134

KATZ, E., E. MARGALITH, 1973 :

Location of vaccinia virus structural polypeptides on the surface of the virus particle.

J. Gen. Virol. 18, 381 - 384

KITAMOTO, N., E. GOTO, S. TANIMOTO, T. TANAKA, H. MIYAMOTO,

N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1984 :

Cross - reactivity between cowpox and vaccinia viruses with monoclonal antibodies.

Arch. Virol. 82, 120 - 136

KOEHLER, G., C. MILSTEIN, 1975 :

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495 - 497

KRAUSS, M., 1985 :

Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von
bovinen Rotaviren im Kot.

Vet.Med.Diss., München

LAEMMLI, U.K., 1970 :

Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T 4.

Nature 227, 680 - 685

LEINIKKI, P.O., J.SHEKARCHI, P.DORSETT, 1978 :

Determination of virus - specific IgM antibodies by
using ELISA : Elimination of false positive results
with protein A - sepharose adsorption and subsequent
IgM antibody assay.

J.Lab.Clin.Med. 92, 849 - 857

LOWRY, O.N., N.J.ROSEBROUGH, L.FARR, R.J.RANDALL, 1951 :

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J.Biol.Chem. 193, 265 - 278

MACKETT, M., L.C.ARCHARD, 1979 :

Conservation and variation in orthopoxvirus genome
structure.

J.Gen.Virol. 45, 683 - 701

MAGNUS, P.von, E.K.ANDERSON, K.B.PETERSON, A.BIRCH -
ANDERSON, 1959 :

A pox - like disease in cynomolgus monkeys.

Acta Path.Microbiol.Scand. 46, 156

MAHNEL, H., A.HERRLICH, 1961 :

Zur Züchtung des Variola - und Alastrimvirus im
bebrüteten Hühnerei.

Zbl.f.Bakt., Paras., Inf. & Hyg. 181, 137 - 149

MAHNEL, H., 1974 :

Labordifferenzierung der Orthopockenviren.

Zbl.Vet.Med.B 21, 242 - 258

MAHR, A., B.E. ROBERTS, 1984 :

Organization of six early transcripts synthesized from a vaccinia Eco RI DNA fragment.

J. Virol. 49, 497 - 509

MALLON (RUSZALA), V., J.A. HOLOWCZAK, 1985 :

Vaccinia virus antigens on the membrane of infected cells. I. Viral antigens transferred from infecting virus particles and synthesized after infection.

Virology 141, 201 - 220

MALLON (RUSZALA), V., E.A. DOMBER, J.A. HOLOWCZAK, 1985 :

Vaccinia virus proteins on the plasma membranes of infected cells. II. Expression of viral antigens and killing of infected cells by vaccinia virus - specific cytotoxic T - cells.

Virology 145, 1 - 23

MALTSEVA, N.N., S.S. MARENNIKOVA, G.R. MATSEVICH, L.G. STEPANOVA, N.A. HABAH PASEVA, 1985 :

Standardization of ELISA for detection of antibodies to orthopoxviruses.

Acta Virol. 29, 294 - 298

MARENNIKOVA, S.S., E.M. SHELUKHINA, N.N. MALTSEVA,

I.D. LADNYI, 1972 :

Poxviruses isolated from clinically ill and asymptotically infected monkeys and a chimpanzee.

Bull. WHO 46, 613 - 620

MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALTSEVA, V.I. KORNEEVA,

N.M. GARANINA, 1977 :

Outbreak of pox disease among Carnivora (Felidae) and Edentata.

J. Infect. Dis. 135, 358 - 366

MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALTSEVA, N.A. HABAH PASEVA, 1981 :

ELISA, a simple test for detecting and differentiating antibodies to closely related orthopoxviruses.

Bull. WHO 59, 365 - 369

- MARENNIKOVA, S.S., E.M.SHELUKHINA, E.V.EFREMOVA, 1984 :
New outlook on the biology of cowpoxvirus.
Acta Virol. 28, 437 - 444
- MARQUARDT, J., S.E.HOLM, E.LYCKE, 1965 :
Immunoprecipitating soluble vaccinia virus antigens.
Arch.Ges.Virusforschung 15, 178 - 187
- MATTHEWS, R.E.F., 1982 :
Fourth report of the international committee on
taxonomy of viruses : Classification and nomenclature
of viruses.
Intervirology 17, 1 - 200
- MAYR, A., E.MUNZ, 1964 :
Veränderung von Vaccinevirus durch Dauerpassagen
in Hühnerembryofibroblasten - Kulturen.
Zbl.F.Bakt., Paras., Inf. & Hyg. 195, 24 - 35
- MAYR, A., E.MUNZ, 1965a :
Plaque - Bildung bei den Geflügelpockenviren.
Arch.Ges.Virusforschung 11, 307
- MAYR, A., E.MUNZ, 1965b :
In : Handbuch der Schutzimpfungen.
Hrsg. HERRLICH, A.,
Springer Verlag, Berlin / Heidelberg
- MAYR, A., 1966 :
Eine schnelle und einfache Methode zur Differenzierung
zwischen Vaccine - und Kuhpockenvirus.
Zbl.Bakt.Orig.I 199, 144
- MAYR, A., H.MAHNEL, E.MUNZ, 1972 :
Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren.
Zbl.Vet.Med.B 19, 69 - 88
- MAYR, A., P.A.BACHMANN, B.BIBRACK, G.WITTMANN, 1974 :
Virologische Arbeitmethoden I
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1977 :
Virologische Arbeitsmethoden II
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- MAYR, A., H. STICKL, H.K. MUELLER, K. DANNER, H. SINGER, 1978 :
Der Pockenimpfstamm MVA : Marker, genetische Struktur,
Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und
Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167, 357 - 390
- MAYR, A., G. EISSNER, B. MAYR - BIBRACK, 1984 :
Handbuch der Schutzimpfungen
Paul Parey Verlag, Berlin / Hamburg
- McCRAE, M.A., T.H. PENNINGTON, 1978 :
Specific secretion of polypeptides from cells
infected with vaccinia virus.
J. Virol. 28, 828 - 834
- MERRILL, C.R., D. GOLDMAN, S.A. SEDMAN, M.H. EBERT, 1981 :
Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide
gels shows regional variation in cerebrospinal -
fluid proteins.
Science 211, 1437 - 1438
- MOSS, B., E.N. ROSENBLUM, 1973 :
Protein cleavage and poxviral morphogenesis :
Tryptic peptide analysis of core precursors
accumulating by blocking assembly with rifampicin.
J. Mol. Biol. 81, 267 - 269
- MOSS, B., 1974 :
Reproduction of poxviruses.
In : Comprehensive Virology 3, 405 - 474
Plenum Press, New York

- MULLER, H.K., R. WITTEK, W. SCHAFFNER, D. SCHUEMPERLI,
A. MENNA, R. WYLER, 1978 :
Comparison of five poxvirus genomes by analysis
with restriction endonucleases *Hin d* III, *Bam* I
and *Eco* RI.
J.Gen.Virol. 38, 135 - 147
- O'FARRELL, P.H., 1975 :
High resolution two - dimensional electrophoresis
of protein.
J.Biol.Chem. 250, 4007 - 4021
- OIE, M., Y. ICHIHASHI, 1981 :
Characterization of vaccinia polypeptides.
Virology 113, 263 - 276
- PAYNE, L.G., 1978 :
Polypeptide composition of extracellular enveloped
vaccinia virus.
J.Virol. 27, 28 - 37
- PAYNE, L.G., 1979 :
Identification of the vaccinia haemagglutinin
polypeptide from a cell system yielding large
amounts of extracellular enveloped virus.
J.Vrol. 31, 147 - 155
- PAYNE, L.G., 1980 :
Significance of extracellular enveloped virus in
the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia.
J.Gen.Virol. 50, 89 - 100
- PENNINGTON, T.H., 1974 :
Vaccinia virus polypeptide synthesis : Sequential
appearance and stability of pre - and postreplicative
polypeptides.
J.Gen.Virol. 25, 433 - 444

PHILLIPS, D.R., M. MORRISON, 1970 :

The arrangement of proteins in the human erythrocyte membrane.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 284 - 289

POLLOCK, R.R., J.L. TEILLAUD, M.D. SCHARFF, 1984 :

Monoclonal antibodies : A powerful tool for selecting and analyzing mutations in antigens and antibodies.

Ann. Rev. Microbiol. 38, 389 - 417

RODRIGUEZ, J.F., R. JANECZKO, M. ESTEBAN, 1985 :

Isolation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies to vaccinia virus.

J. Virol. 56, 482 - 488

ROUMILLAT, L.F., J.L. PATTON, M.L. DAVIS, 1984 :

Monoclonal antibodies to a monkeypox virus polypeptide determinant.

J. Virol. 52, 290 - 292

SAROV, I., W.K. JOKLIK, 1972 :

Studies on the nature and location of the capsid polypeptides of vaccinia virions.

Virology 50, 579 - 592

SILVER, M., S. DALES, 1982 :

Biogenesis of vaccinia : Interrelationship between posttranslational cleavage, virus assembly and maturation.

Virology 117, 341 - 356

SMADEL, J.E., T.M. RIVERS, C.L. HOAGLAND, 1942 :

Nucleoprotein antigen of vaccine virus : I. A new antigen obtained from elementary bodies of vaccinia.

Arch. Path. 34, 275

SMITH, E.C., B.C.PRATT, D.BAXBY, 1973 :

In vitro dissociation and reconstruction of
poxvirus haemagglutinin.

J.Gen.Virol. 18, 111 - 118

SMITH, L.G., B.MOSS, 1984 :

Uses of vaccinia virus as a vector for the
production of live recombinant vaccines.

Bio Essays 1, 120 - 124

STERN, W., S.DALES, 1974 :

Biogenesis of vaccinia virus : Concerning the
origin of the envelope phospholipids.

Virology 62, 293 - 306

STERN, W., S.DALES, 1976a :

Biogenesis of vaccinia virus : Isolation and
characterization of a surface component that
elicits antibody suppressing infectivity and
cell - cell fusion.

Virology 75, 232 - 241

STERN, W., S.DALES, 1976b :

Biogenesis of vaccinia virus : Relationship of
the envelope to virus assembly.

Virology 75, 242 - 255

TAGAYA, I., T.KITAMURA, Y.SANO, 1961 :

A new mutant of dermovaccinia virus.

Nature (London) 192, 381 - 382

TAPPERT, H., 1981 :

Versuche zur Produktion von monoklonalen
Antikörpern gegen Rotaviren.

Vet.Med.Diss., München

TOWBIN, H., T. STAEGELIN, J. GORDON, 1979 :

Electrophoretic transfer of proteins from
polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets :
Procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350 - 4354

TOWBIN, H., J. GORDON, 1984 :

Immunoblotting and dot immunobinding :
Current status and outlook.

J. Immunol. Meth. 72, 313 - 340

WEEKLY EPIDEM. REC., 1984, 59, 181 - 188

Human monkeypox update : Results of the past five
years of surveillance.

WEEKLY EPIDEM. REC., 1985, 60, 393 - 400

Smallpox : Post eradication surveillance.

WEINTRAUB, S., S. DALES, 1974 :

Biogenesis of poxviruses : Genetically controlled
modifications of structural and functional
components of the plasma membrane.

Virology 60, 96 - 127

WESTERWOUTD, R. J., A. M. NAIPAL, C. M. H. HARRISON, 1984 :

Improved fusion technique. II. Stability and
purity of hybrid clones.

J. Immunol. Meth. 68, 89 - 101

WESTWOOD, J. C. N., H. T. ZWARTOUW, G. APPLEYARD, D. H. J.

TITMUS, 1965 :

Comparison of the soluble antigens and virus
particle antigens of vaccinia virus.

J. Gen. Microbiol. 38, 47 - 53

WILTON, S., J. GORDON, S. DALES, 1986 :

Identification of antigenetic determinants by polyclonal and hybridoma antibodies induced during the course of infection by vaccinia virus.

Virology 148, 84 - 96

WITTEK, R., A. MENNA, D. SCHUEMPERLI, S. STOFFEL, H. K. MULLER, K. WYLER, 1977 :

Hin d III and Sst I restriction sites mapped on rabbitpox virus and vaccinia virus.

J. Virol. 23, 669 - 678

WITTEK, R., 1982 :

Organization and expression of the poxvirus genome.

Experientia 38, 285 - 297

WITTEK, R., B. RICHNER, G. HILLER, 1984a :

Mapping of the genes coding for the two major vaccinia virus core polypeptides.

Nucl. Acids Res. 12, 4835 - 4848

WITTEK, R., M. HAENGGI, G. HILLER, 1984b :

Mapping of a gene coding for a major late structural polypeptide on the vaccinia virus genome.

J. Virol. 49, 371 - 378

Herrn Prof. Dr. h.c.mult. A.MAYR möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes danken.

Die Einführung in das Arbeitsgebiet " Vacciniavirus " erfolgte durch Prof. Dr. P.A.BACHMANN † .

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.MAHNEL für die bereitwillige Fortführung der Arbeit nach dem Tod von Prof. Bachmann und die mir jederzeit gewährte Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Dr. W.EICHHORN danke ich herzlich für die fundierte Beratung in technischen Fragen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Den Mitarbeitern der Isolierstation danke ich für die freundliche Aufnahme und die hilfsbereite Einführung in die Laborarbeiten.

Für diese Arbeit stand ein Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses an Hochschulen in Bayern zur Verfügung, wofür ich ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte.

1960	geboren am 20.07. als zweites Kind der Landwirte Johann und Marianne Reitelshöfer, geb. Bauer in Neuendettelsau
1966	Eintritt in die Grundschule Petersaurach
1970 - 1979	Laurentius - Gymnasium Neuendettelsau
1979 - 1984	Studium der Tiermedizin an der Ludwig - maximilians - Universität München
15.11.1984	Staatsexamen
15.03.1985	Approbation als Tierärztin und Beginn der vorliegenden Dissertation
28.08.1985	Heirat mit dem Tierarzt Manfred Kern
15.05.1986	Geburt des gemeinsamen Sohnes Andreas

